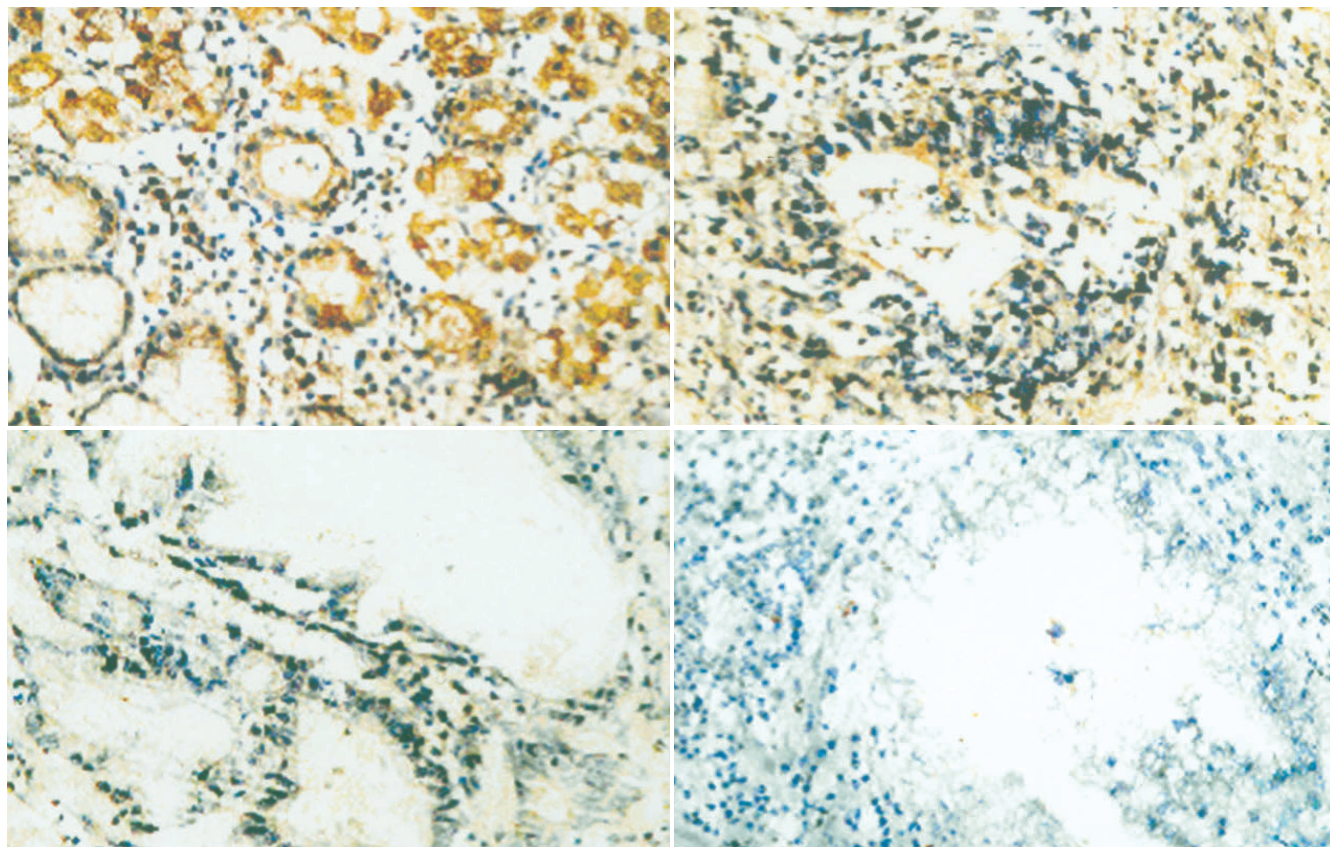


世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 1 月 18 日 第 14 卷 第 2 期 (Volume 14 Number 2)



2 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议,是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。

《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授	北京
黄象谦教授	天津
黄志强教授	北京
裘法祖教授	武汉
王宝恩教授	北京
危北海研究员	北京
吴孟超教授	上海
杨春波教授	福州
周殿元教授	广州

名誉总编辑

潘伯荣教授	西安
-------	----

社长/总编辑

马连生教授	北京
-------	----

副总编辑

陈士葆教授	上海
房殿春教授	重庆
姜洪池教授	哈尔滨
王苑本教授	天津
吴云林教授	上海
徐克成教授	广州
杨思凤教授	吉林
姚希贤教授	石家庄
岳茂兴教授	北京
张万岱教授	广州
周学文教授	沈阳

常务编委

程英升副教授	上海
高毅主任医师	广州
江学良副主任医师	上海
李岩教授	沈阳
刘连新教授	哈尔滨
吕宾教授	杭州
罗和生教授	武汉
聂青和副教授	西安
王小众教授	福州

编委

白爱平主治医师	广州
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨

蔡淦教授	上海
曹洁副教授	上海
陈海龙教授	大连
陈红松副研究员	北京
陈积圣教授	广州
陈建荣副教授	南通
陈立波副教授	武汉
陈凇教授	北京
陈其奎教授	广州
陈强谱教授	滨州
陈仕珠主任医师	西安
陈卫昌教授	苏州
陈耀凯副教授	重庆
陈贻胜教授	福州
陈知水教授	武汉
陈治水主任医师	哈尔滨
陈祖林副教授	重庆
程爱国教授	唐山
程红岩教授	上海
迟宝荣教授	长春
崔云甫教授	哈尔滨
代文杰教授	哈尔滨
戴冬秋教授	沈阳
党双锁副教授	西安
邓长生教授	武汉
董蕾教授	西安
杜群副研究员	广州
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
傅春彬主任医师	吉林
高成新教授	上海
高春芳研究员	上海
高峰教授	西安
高润平教授	长春
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
谷俊朝主任医师	北京
关玉盘教授	北京
管冬元副教授	上海
郭克建教授	沈阳
郭晓钟教授	沈阳
郭新宁教授	银川

韩天权教授	上海
郝俊鸣副主任医师	北京
何超教授	杭州
何裕隆教授	广州
何振平教授	重庆
洪天配教授	北京
侯晓华教授	武汉
黄恒青主任医师	福州
黄金华副教授	广州
黄晓东副主任医师	武汉
黄颖秋教授	本溪
黄裕新教授	西安
黄志勇副教授	武汉
季国忠副教授	南京
季加孚教授	北京
姜慧卿教授	石家庄
蒋龙元副教授	广州
金瑞教授	北京
匡安仁教授	成都
兰平教授	广州
蓝宇教授	北京
劳绍贤教授	广州
李定国教授	上海
李东辉教授	厦门
李方儒教授	天津
李国威教授	西安
李继强教授	上海
李靖副教授	重庆
李奇林教授	广州
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李玉民教授	兰州
李增山副教授	西安
李兆申教授	上海
李志霞教授	北京
李宗芳教授	西安
梁力建教授	广州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘杞教授	重庆

世界华人消化杂志®

编辑委员会

刘铁夫教授	哈尔滨	孙家邦教授	北京	许文燮教授	上海
刘正稳教授	西安	孙秀发教授	武汉	严律南教授	成都
刘作金副教授	重庆	孙学英教授	哈尔滨	杨冬华教授	广州
龙致贤教授	北京	邵升副教授	哈尔滨	杨广顺教授	上海
鲁华玉研究员	北京	谭学瑞教授	汕头	杨建勇教授	广州
陆才德教授	宁波	汤展宏副教授	南宁	杨林副研究员	广州
陆云飞教授	南宁	唐芙爱教授	郑州	杨维良教授	哈尔滨
禄韶英主治医师	西安	唐霓副研究员	重庆	杨希山教授	广州
吕明德教授	广州	唐文富主治医师	成都	杨云生教授	北京
吕宁主任医师	北京	唐文皓副主任医师	上海	姚登福教授	南通
吕云福教授	海口	唐旭东主任医师	北京	姚树坤教授	石家庄
马大烈教授	上海	唐志鹏副研究员	上海	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
茅爱武主任医师	上海	田素礼教授	哈尔滨	阴赓宏研究员	北京
梅林教授	北京	屠红副研究员	上海	于红刚副教授	武汉
孟庆华教授	北京	万德森教授	广州	于健春教授	北京
宁琴教授	武汉	万军教授	北京	于颖彦教授	上海
牛建昭教授	北京	汪波副主任医师	北京	郁宝铭教授	上海
欧希龙副教授	南京	王承党副教授	福州	喻荣彬副教授	南京
潘林娜教授	哈尔滨	王春友教授	武汉	张柏和教授	上海
潘兴华副主任医师	昆明	王广义教授	长春	张方信主任医师	兰州
潘秀珍教授	福州	王吉耀教授	上海	张吉翔教授	南昌
彭波副教授	西安	王鲁副教授	上海	张锦生教授	上海
彭吉润主任医师	北京	王效民教授	厦门	张军教授	西安
彭曦副研究员	重庆	王学美研究员	北京	张青云研究员	北京
彭心宇教授	石河子	王正康教授	北京	张群华教授	上海
彭志海教授	上海	王志刚副主任医师	上海	张水军教授	郑州
秦波教授	重庆	王忠裕教授	大连	张绪清副教授	重庆
秦成勇教授	济南	卫洪波教授	广州	张学教授	北京
秦环龙教授	上海	魏经国教授	西安	张宗明教授	北京
钱建民教授	上海	魏来教授	北京	赵桂珍教授	沈阳
秦仁义教授	武汉	闻勤生教授	西安	赵景民教授	北京
卿三华教授	广州	吴德全教授	哈尔滨	赵连三教授	成都
邱双健副教授	上海	吴建国教授	武汉	赵平副教授	上海
任超世研究员	天津	吴君主任医师	贵阳	郑民华教授	上海
任建安教授	南京	席启主任医师	大同	智发朝教授	广州
任建林教授	厦门	夏建川研究员	广州	周伯平教授	深圳
邵成浩讲师	上海	向德兵讲师	重庆	周丁华主任医师	北京
邵先玉教授	泰安	肖恩华教授	长沙	周士胜教授	大连
邵永孚教授	北京	谢晓华副教授	广州	周霞秋教授	上海
沈洪教授	南京	徐爱民副教授	上海	周晓东研究员	广州
沈琳副教授	北京	徐存拴教授	新乡	朱春兰主任医师	哈尔滨
沈薇教授	重庆	徐大华副主任医师	北京	朱立元教授	深圳
施瑞华教授	南京	徐德忠教授	西安	朱人敏教授	南京
石统东副教授	重庆	徐列明教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
宋振顺教授	西安	徐小元教授	北京	左国营副主任药师	昆明
孙诚谊教授	贵阳	许玲副教授	上海		

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2006年1月18日

第14卷

第2期

(总第154期)

特别报道

131 吴孟超: 神刀济苍生 肝胆照人间

述 评

134 腹腔热灌注化疗治疗胃肠癌 魏志刚, 卿三华

基础研究

138 胃癌TIMP3基因启动子甲基化及其蛋白表达的研究 关志宇, 戴冬秋

144 温热体外对人胃癌细胞株生物学行为的影响

汤睿, 朱正纲, 瞿颖, 李建芳, 纪玉宝, 刘炳亚, 燕敏, 林言箴

152 中药肝炎平对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠TGFβ₁/Smad信号通路的影响

熊章鄂, 但自力, 唐望先, 严红梅

158 大肠杆菌表面CS3菌毛展示随机肽库的构建

刘向昕, 袁盛凌, 展德文, 郑继平, 刘纯杰, 王芃, 王令春, 张兆山

163 PGE₂在内毒素诱导的幼鼠急性胃黏膜损伤中的变化及PAF受体拮抗剂对其影响

刘春英, 王丽杰, 孙梅, 赵恂, 胡月, 赵雅娟, 李军

167 慢性乙型肝炎患者高迁移率族蛋白1 mRNA的表达及其临床意义

彭建平, 范学工, 刘洪波

173 益肝康等活血化瘀中药抑制IL-1β刺激的HSC增殖及TIMP-1的表达

赵霞, 姚希贤, 张亚平, 郑文明

179 全反式维甲酸对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏TGF-β1、CTGF和Colla1表达的影响

付好, 但自力, 唐望先, 晏维, 潘志红, 熊章鄂

184 5-Aza-CdR对人结肠癌Lovo细胞增殖凋亡及抑癌基因RUNX3表达的影响

倪志, 刘南植, 李林芳, 张庆, 李秀梅, 洪玮

文献综述

189 促胃肠动力药的作用机制及临床应用研究进展 石刚, 吴硕东

197 针刺疗法治疗功能性肠疾病的研究进展 李文波, 刘诗

201 Wnt/β-catenin信号通路与大肠癌的始发和防治策略

李琳娜, 袁守军

207 结直肠癌淋巴管生成与淋巴结转移相关检测的临床研究进展

黄漾, 张国锋

研究快报

212 TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu、Arg677Trp多态性与中国湖北汉族炎症性肠病

无相关性 熊利芬, 夏冰, 姜黎, 郭秋莎, 孙泽群

216 促甲状腺激素释放激素在应激性溃疡致病过程中的作用

郭益民, 李旭, 陈然, 夏钦贵

220 人胚胎肝干细胞的形态特点

蒋吉英, 赵立民, 张杰, 齐安东, 于树娜

225 厦门地区大肠癌人群某些遗传性易感因子和抗性因子的研究

黄如欣, 游攀, 陈长荣, 张忠英, 倪宏英, 刘广发, 任建林

临床经验

230 经内镜乳头括约肌切开术与气囊扩张术治疗胆总管结石临床评价

李春明, 刘中宏, 姜国玲, 张兆文

234 视黄醇脂对慢性酒精性肝病患者肝脏纤维化的抑制作用

刘中宏, 郑长青, 李春明

238 NF-κB在溃疡性结肠炎激素抵抗中的意义

刘一品, 李延青

病例报告

242 自体骨髓干细胞肝移植1例 朱晓玲, 邢煜, 时冰, 李艳

致 谢	244 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	151 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 178 第一届全国临床营养支持学术会议通知 183 加入台湾华艺CEPS中文电子期刊服务声明 188 更正与说明专栏 196 我国科技论文总数连续三年世界第五 211 《现代消化及介入诊疗》杂志征稿、征订启事 229 专家门诊 237 技法与经验 243 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知
封面故事	关志宇, 戴冬秋. 胃癌TIMP3基因启动子甲基化及其蛋白表达的研究. 世界华人消化杂志 2006;14(2):138-143 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/138.asp
国际会议	10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net EasI 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006 Canadian Digestive Disease Week Conference March 4-12, 2006 www.cag-acg.org XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2006-01-18
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 管鑫妍
中文编辑 潘伯荣 张海宁 管鑫妍
电子编辑 张敏 张勇 李琪
本期审读 王谨晖

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

January 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 2

SPECIAL COLUMN	131 Meng-Chao Wu: an outstanding surgeon who devoted himself to patients
EDITORIAL	134 Treatment of gastrointestinal carcinoma with continuous hyperthermic peritoneal perfusion chemotherapy <i>Wei ZG, Qing SH</i>
BASIC RESEARCH	<p>138 Promoter methylation and expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene in gastric cancer <i>Guan ZY, Dai DQ</i></p> <p>144 Impact of hyperthermia on human gastric cancer cell lines <i>in vitro</i> <i>Rui T, Zhu ZG, Qu Y, Li JF, Ji YB, Liu BY, Yan M, Lin YZ</i></p> <p>152 Effects of traditional Chinese medicine <i>Ganyanping</i> on TGFβ_1/Smad signaling pathway in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis of rats <i>Xiong ZE, Dan ZL, Tang WX, Yan HM</i></p> <p>158 Construction of a CS3 fimbria-displayed random peptide library on <i>Escherichia coli</i> cell surface <i>Liu XX, Yuan SL, Zhan DW, Zheng JP, Liu CJ, Wang P, Wang LC, Zhang ZS</i></p> <p>163 Change of prostaglandin E₂ and effect of platelet activating factor antagonist on prostaglandin E₂ in endotoxin-induced acute gastric mucosal injury in young rats <i>Liu CY, Wang LJ, Sun M, Zhao X, Hu Y, Zhao YJ, Li J</i></p> <p>167 Expression of high mobility group box-1 protein mRNA in patients with chronic hepatitis B and its clinical significance <i>Peng JP, Fan XG, Liu HB</i></p> <p>173 <i>Yigankang</i> inhibits proliferation of hepatic stellate cells and expression of TIMP-1 mRNA induced by interleukin-1β <i>Zhao X, Yao XX, Zhang YP, Zheng WM</i></p> <p>179 Effect of all-trans retinoic acid on expression of TGF-β_1, CTGF and Col1a1 in chronic alcoholic liver disease in rats <i>Fu Y, Dan ZL, Tang WX, Yan W, Pan ZH, Xiong ZE</i></p> <p>184 Effects of 5-Aza-CdR on cell proliferation and apoptosis in colonic cancer cell line Lovo and expression of tumor suppressor gene RUNX3 <i>Ni Z, Liu NZ, Li LF, Zhang Q, Li XM, Hong W</i></p>
REVIEW	<p>189 Research progress in mechanism of gastroprokinetic drugs and its clinical application <i>Shi G, Wu SD</i></p> <p>197 Progress of acupuncture therapy in treatment of functional bowel diseases <i>Li WB, Liu S</i></p> <p>201 Relations of Wnt/β-catenin signal pathway with colorectal carcinoma and its corresponding preventive and therapeutic strategy <i>Li LN, Yuan SJ</i></p> <p>207 Clinical advance in related examination for angiogenesis and lymph node metastasis of colorectal carcinoma <i>Huang Y, Zhang GF</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>212 No association of TLR4 gene Asp299Gly, TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp polymorphisms with inflammatory bowel disease in Chinese Han population of Hubei province <i>Xiong LF, Xia B, Jiang L, Guo QS, Sun ZQ</i></p> <p>216 Role of thyrotropin-releasing hormone in formation of stress ulcer</p>

	<p><i>Guo YM, Li X, Chen R, Xia QG</i></p> <p>220 Morphological characteristics of human embryonic hepatic stem cells <i>Jiang JY, Zhao LM, Zhang J, Qi AD, Yu SN</i></p> <p>225 Sensitive and resistant genetic factors related to colorectal cancer in patients from Xiamen <i>Huang RX, Pan You, Chen CR, Zhang ZY, Ni HY, Liu GF, Ren JL</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>230 Clinical evaluation of endoscopic sphincterotomy and papillary balloon dilation for removal of common bile duct stones <i>Li CM, Liu ZH, Jiang GL, Zhang ZW</i></p> <p>234 Effect of vitamin A on hepatic cirrhosis in patients with chronic alcoholic liver disease <i>Liu ZH, Zheng CQ, Li CM</i></p> <p>238 Role of nuclear factor-kappa B expression in steroid-resistant ulcerative colitis <i>Liu YP, YQ Li</i></p>
CASE REPORT	<p>242 Autologous bone marrow and stem cell transplantation into liver in one patient <i>Zhu XL</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>244 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Guan ZY, Dai DQ.</i> Promoter methylation and expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene in gastric cancer . <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(2):138-143 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/138.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net</p> <p>Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006</p> <p>Canadian Digestive Disease Week Conference March 4-12, 2006 www.cag-acg.org</p> <p>XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx</p> <p>World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com</p>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date January 18, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjgd@wjgnet.com

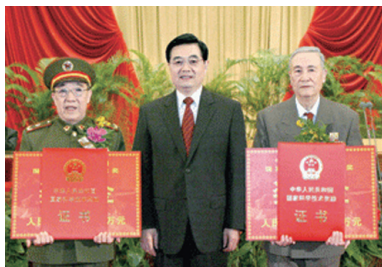
<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

吴孟超：神刀济苍生 肝胆照人间

《科学时报》记者 任黎明



2006-01-01, 北京, 天气晴好, 记者在友谊宾馆见到了吴孟超院士。在近2 h

的谈话中, 他精神矍铄、思绪敏捷、言语清晰, 浑然不似已过80高龄的老人。据同行的吴老学生透露, 现在只要有时间, 吴老依然亲自给患者做手术, 有时一天下来会连续做三台, 要站上十几个小时。

治疗肝癌 勇闯禁区

吴孟超告诉记者, 我国是肝癌高发的国家, 全球每年新增的肝癌患者, 约43%发生在我国大陆, 一年发病者达到40万。由于肝癌最难发现、最难治疗、发展最快、复发最多, 已经成为影响我国人民健康的第二大肿瘤杀手; 同时我国有庞大的肝癌危险人群, 即1.2亿乙型肝炎病毒携带者, 因此, 肝癌的防治工作一直是我国医学界面临的重大难题。

" 在20世纪50年代, 我国还没有独立的肝脏外科, 包含在普通外科里面。" 作为我国肝脏外科的主要创始人, 吴孟超从1956年开始从事肝脏外科事业, " 当时一位国外权威预言, 中国人要有自己的肝脏外科, 起码要等二三十年。我听了很不服气, ' 当时就写下 ' 卧薪尝胆, 勇闯禁区 ' 的誓言, 一定要把我国自己的肝脏外科搞起来 "。

肝脏在人体复杂的生命过程中, 担负着物质代谢、解毒排泄、造血和凝血等数千种功能, 是 " 人体化工厂 " 和 " 营养库 ", 一旦出现恶性肿瘤, 很快就会危及生命。由于肝脏内血管密布, 胆管、淋巴管叠合交叉, 治疗肝癌的主要方法—手术切除极易导致大出血, 成功率很低。吴孟超清醒地知道自己选择的不是坦途。要想在当时国内视为禁区的肝脏手术上做出成绩, 首先要了解肝脏, 掌握肝脏内部的解剖结构。

" 那时国际上尚无统一和公认的肝脏解剖理论, 就必须自己想办法。" 吴孟超决定自己动手做肝脏标本, 经过翻阅大量资料, 他了解到, 一个理想的标本是用4种不同颜色的液态塑料, 分别注入肝脏的肝动脉、肝静脉、门静脉和胆管4种管道系统内, 待塑料成为固态后再用腐蚀剂把塑料外面的肝脏组织全部腐蚀掉, 就成了一架肝内各种管道的主题构型。

" 但是当时要找合适的塑料灌注很困难, 没有什么可以借鉴, 我们试验了几十次, 电影胶片、X光片等都试过了, 都凝不住。几个月下来这个问题一直困扰着我, 1959-02, 容国团在第25届世乒赛上为中国夺得首枚男子单打世界冠军的好消息传来, 振奋之余, 我突然想到乒乓球也是用一种叫赛璐珞的塑料做的, 何不试一下。"

机遇总是青睐善于捕捉他的人, 吴孟超这次成功了, 1959-04, 制成了中国第一具能满足科研需要的肝脏腐蚀标本, 在突破禁区的道路上迈进了坚实的一步。

在陆续完成的200多个肝脏标本攀援缠绕的无序状态中, 吴孟超找到了血管走向的分布规律。1960年, 在北京召开的第七届全国外科学会议上, 吴孟超提出了至今仍在沿用的中国人肝脏解剖经典理论— " 五叶四段 " 理论。这一理论将人体肝脏分成 " 左外、左内、右前、右后和尾状 " 五个叶, 又将左外叶和右后叶各分两个段, 实现了中国肝脏解剖理论的重大突破, 为我国肝脏外科奠定了重要的解剖学基础。

1960-03-01, 已经掌握了进入肝脏禁区密码的吴孟超主刀完成了中国第一例成功的肝脏手术, 实现了中国肝脏外科零的突破。此前, 对肝脏出血的控制, 国外常用解剖肝门结扎血管或低温下暂时阻断血流的方法, 操作比较复杂、危险性大。吴孟超打破禁区后再接再厉, 创造了 " 常温下间歇肝门阻断 " 止血技术, " 肝脏缺血超过二十分钟就要坏死, 不能太长时间止血。我想到了水龙头开关, 就在血管上加了一个类似装置, 手术开始时阻断, 一段时间后打开, 让血液流向

全国科学技术大会于2006-02-09在人民大会堂开幕, 中国科学院院士、中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院院长吴孟超(本刊总顾问)、中国科学院院士、中国科学院大气物理研究所名誉所长叶笃正, 荣获2005年度国家最高科学技术奖。国家最高科学技术奖每年授予人数不超过2名, 获奖者奖金为500万元人民币。

吴孟超, 1922年生于福建, 现任中国科学院院士、中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院院长, 主要科技成就有: 提出“五叶四枝”解剖学理论; 建立“常温下间歇肝门阻断止血技术”; 发现“正常和肝硬化肝脏术后生化代谢规律”; 提出“肝癌复发再手术”观点。

肝脏. 可以阻断几次, 提高了安全性, 有利于手术顺利完成. 这个方法现在还在临床使用. "

1963年, 吴孟超又和同事们成功地为一位患者实施了中肝叶切除手术. 中肝叶是肝内所有重要管道都要经过的"禁区中的禁区", 这一成功是中国肝脏手术的重大飞跃, 标志着中国肝脏外科已经跻身世界先进行列.

在无止境的探索革新创造中, 吴孟超书写了一连串的第一: 第一个在国内开展肝叶切除后人体代谢改变的研究, 有效控制了术后肝昏迷等并发症; 第一次采用肝动脉结扎和栓塞法治疗晚期肝癌患者; 第一次施行腹腔镜下切除血管瘤手术……吴孟超创立的肝脏外科关键理论和技术, 为肝脏手术的成功实施和广泛开展提供了保障, 肝脏手术死亡率由20世纪50年代的33%, 降低为60-70年代的8.48%, 80年代的0.43%和90年代的0.35%, 在国内外居领先水平.

被问及为何不断创新、勇闯禁区时, 吴孟超说, "我这个人认定一个事情, 就要做好. 早在踏上肝脏外科科研道路时, 我就以‘自力更生, 艰苦奋斗, 奋发图强, 勇攀高峰’勉励自己和同事. 就要有这个韧性, 要做的事情, 没有变通, 救治患者就不要怕担风险, 如果前怕狼后怕虎, 那么禁区永远是禁区, 患者也只能在医生的摇头与沉默中抱憾离开人世了."

吴氏刀法 无欲无求

在武侠小说中, 武林高手能眼观六路、耳听八方, 闭上眼睛也能指哪打哪. 吴孟超拿的虽然是手术刀, 却也有一套举世无双的"吴氏刀法", 只要施展开来, 闭着眼睛也能切除肝脏部位的肿瘤. 听吴老的学生说, 他做手术时眼睛并不是总盯着手术部位, 而是看着前方——只见他的双手在腹腔里游刃有余, 肿瘤就被摘下来了, 出神入化, 令人叹为观止.

"吴氏刀法"曾经多次震惊世界: 1975-02, 吴孟超为安徽一农民成功切除了重达18公斤的特大肝海绵状血管瘤, 直到今天, 这仍是外科界的一项世界纪录; 1983年, 吴孟超为一名仅4个月大的女婴成功摘除重达600克的肝母细胞瘤, 切下来的肿瘤比婴儿的脑袋还要大……

吴孟超并不满足, 当越来越多的患者出现在面前时, 他考虑招收更多人才充实到肝病治疗中来, 还无私传授自己的"吴氏刀法". "为了诊治更多肝癌患者, 我的所有技术属于人类, 我吴孟超没有专利!" 如何选刀、如何目测、如

何分离、如何打结、如何预防和处理各种险情, 他对学生严教细训, 一丝不苟. 吴孟超至今已经培养了2 000多名进修生, 他们大多都回到原来的岗位, 成为各单位肝胆外科的带头人.

1979年, 吴孟超抓住恢复研究生招生的时机, 招收了第一批硕士生, 之后又牵头建立了博士点和博士后流动站. "肝癌的研究不是我们这一代能彻底解决的", 吴孟超很明白人才的重要性, 目前他创立的东方肝胆外科医院和研究所已经成为中国肝胆外科的人才库, 吴孟超本人带出硕士生80名、博士生59名、博士后21名, 其中18人次获得了中国青年科学家、长江学者奖励计划特聘教授、总后科技金星等奖项……

"我们医院和研究所已经形成了一个人才梯队, 只有保持稳定的梯队, 才能发展, 自主创新, 形成不断的冲击." 吴孟超因材施教, 把好苗子送出国门去培养, "国内有人才资源优势, 国外有设备、有资金, 两相结合更容易出人才、出成果. 要最终攻克肝癌这个顽症, 必须靠临床与基础相结合. 我们形成了一种国际科技合作新模式——‘哑铃模式’, 就是在国内建立研究中心, 与国外同行统一课题、合作研究, 双方学者穿梭其中, 互相交流、互相支持."

为了促进肝胆外科的学科发展, 吴孟超用自己多年来所获得的各类奖金30万元和社会各界捐赠的400万元设立了"吴孟超肝胆外科医学基金". 这是我国首个肝脏外科领域的专项基金, 用于奖励国内外对肝脏外科作出显著贡献的优秀人才. 目前, 基金已发展成为"上海吴孟超医学科技基金会", 总额已达1 000万元.

谈到这次获得2005年度国家科学技术奖, 吴孟超说, "对个人来讲, 这是无上的光荣, 但这个奖项包括很多人的共同努力, 不只是我一个人的." "我们希望从阻断发病源头、转移路径等方面入手研究, 争取早日攻克肝癌顽症, 现在要做的是总结过去的经验, 不断探索新的研究方法." 吴孟超告诉记者, "今后还有大量的工作, 一方面为人民的健康多做一些工作, 另一方面, 多培养新一代的医药工作者, 为他们提供发展的机遇和平台".

爱护患者 "肝胆" 相照

提到现在社会上颇为紧张的医患关系, 吴孟超说, "对医生来说, 救死扶伤是神圣职责, 首先要有爱心, 爱护患者; 第二, 要真心为患者服务;

第三, 技术要强, 能够为患者解决问题; 第四, 要经常联系(患者), 做面对面的交流, 这样才有利于患者和医生的关系。"

吴孟超说, "只想赚钱就坏了, 医生开很多药, 很贵, 却不能解决问题, 这在我们医院是绝对不允许的。" 东方肝胆外科医院医疗部主任沈锋告诉记者, 如果发现有的医生明明可以用便宜药却用了贵的, 吴老就会批评他。"他对医生非常严格, 要求必须选择最适合的治疗方案。"

"我对患者一视同仁, 不分高低贵贱都一样对待。患者很痛苦, 不仅本人痛苦, 全家都很痛苦, 医生最根本的责任就是为患者解除痛苦, 用自己的技术为患者治好病。对待患者不仅要有责任心, 还要有爱心和同情心。" 吴孟超回忆起自己诊治过的一位21岁的女孩, "发现是肿瘤后, 万念俱灰, 找到我, 他们全家就跪下了, 这时我们医生是什么心情, 患者是什么心情, 两者的心情要统一起来, 医生要知道患者的心情, 安慰他, 鼓励他, 为患者解决问题。开刀割掉一个4.5公斤的肿瘤后, 她好了起来, 全家很感激我, 出院时要请我吃饭。其实, 患者好了, 医生就非常高高兴, 我说饭就免了, 希望她以后注意饮食, 讲究合理的生活方式, 保持身体健康。"

沈锋永远忘不了第一次随吴老查房的情景: 那是一个冬天, 吴老去给一名刚入院的农村患者查房, 进病房后不是直接把手伸到患者身上探摸, 而是先把手暖热, 再轻轻撩起患者的衣服……这个动作让沈锋差点掉下眼泪。现在, 沈锋也像吴老当年那样, 冬天查房时先把手暖热, 离开时还不忘帮患者把被角掖好。

83岁的吴孟超现在不挂门诊了, 但依然会有慕名而来的患者找上门来。有时, 半夜才做完手术的吴孟超在自家门前碰到求助的患者, 尽管秘书已经在挡驾, 但吴孟超还是一次又一次地仔细询问病情; 有时, 患者早早在医院等候, 等吴孟超的车刚停就拿出片子来, 吴老来者不拒, 就站在路边看片子, 和患者一说就是十几分钟。

沈锋告诉记者, 吴老还坚持亲自查房, 亲自为患者动手术, 仅2004年就主刀手术312例, 指导手术500余例, 指导实验研究时间超过200小时。也许有人会奇怪, 在很多人看来已经"功成名就"的吴孟超何苦如此? 或许, 吴孟超自己说过的一段话可以为他的行动做一个很好的注脚: "一个好医生, 在品格上至少要具备三种精神——无欲无求的献身精神, 救治患者的人道精神, 求实求是的科学精神。"

腹腔热灌注化疗治疗胃肠癌

魏志刚, 卿三华

■背景资料

腹腔热灌注化疗(CHPPC)综合利用腹腔化疗(IPC)、热疗和大容量化疗液对腹腔的机械灌注作用, 有较大的药代动力学和流体动力学优势, 能有效清除游离癌细胞和微小癌灶, 有效防治胃肠恶性肿瘤术后腹腔复发和肝转移, 为胃肠癌的治疗提供一种较有前途的新途径。

魏志刚, 卿三华, 南方医科大学南方医院普通外科 广东省广州市 510515

魏志刚, 男, 1980-12-11生, 河南省汝南县人, 汉族, 硕士, 主要从事肠恶性肿瘤治疗研究. weizg2004@eyou.com

通讯作者: 卿三华, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院普通外科. Sanhuaq@fimmu.com

电话: 020-6287626

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-12-10

摘要

腹腔热灌注化疗是防治腹腔恶性肿瘤, 尤其胃肠癌术后腹腔复发和肝转移的一项重要措施。其综合利用局部化疗、热疗和大容量化疗液对腹腔的机械灌注作用, 具有药代动力学及流体动力学优势, 能有效清除游离癌细胞及微小癌灶, 防治术后腹腔复发和肝转移。我们就腹腔热灌注化疗治疗胃肠癌加以综述。

关键词: 腹腔热灌注化疗; 胃肠癌; 腹腔复发; 肝转移

魏志刚, 卿三华. 腹腔热灌注化疗治疗胃肠癌. 世界华人消化杂志 2006;14(2): 134-137

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/134.asp>

0 引言

腹腔内复发和肝转移是腹腔恶性肿瘤, 尤其是胃肠道癌术后最主要的致死原因, 至今仍无行之有效的防治方法。国内外学者对此作了大量研究, 1988年Fujimoto *et al*^[1]在腹腔化疗(intraperitoneal chemotherapy, IPC)的基础上, 利用热疗能增加抗癌药疗效的热动力效应, 综合性地把热疗和化疗相结合, 首次利用腹腔热灌注化疗(continuous hyperthermic peritoneal perfusion chemotherapy, CHPPC)技术治疗胃肠恶性肿瘤, 为胃肠癌的治疗提供了新途径。目前该技术日益引起重视, 近年来国内外学者对CHPPC在胃肠恶性肿瘤防治方面作了广泛深入的研究, 使CHPPC在理论、方法以及临床应用方面进一步得到完善, 使该疗法成为胃肠癌术后腹腔复发和肝转移较重要的防治措施。

1 胃肠癌术后腹腔复发转移的机制

腹腔内游离癌细胞(FCC)和残留微小癌灶的存

在是胃肠恶性肿瘤术后腹腔内复发和肝转移的主要因素。

1.1 腹腔内游离癌细胞来源 (1) 癌细胞侵透胃肠浆膜直接脱落到腹腔, 其阳性率与浆膜受浸润面积及肿瘤生物学特性有关^[2,3]。(2) 手术时标本切缘的癌细胞脱落或手术区域切断的血管、淋巴管内的癌细胞随血液、淋巴流入腹腔^[4], 尤其是在血管和淋巴管内有癌栓形成者为甚。(3) 术中未采取妥善隔离措施, 脱落入腹腔内的癌细胞随肠液经肠祥切断端流入腹腔^[5]。

1.2 腹腔内残留微小癌灶 腹腔内残留微小癌灶主要包括: (1) 术中镜下显微癌灶和手术无法彻底切除的微小癌灶; (2) 术野内渗出的纤维蛋白凝固物形成保护腹腔内癌细胞的隔离层, 使之不易被免疫活性细胞所吞噬, 形成残存小癌灶。

1.3 腹腔内FCC的种植转移 腹腔内FCC种植转移比血管、淋巴管内种植转移更易发生, 即使术后腹腔内有少量FCC存在, 手术区域和受损腹膜表面也会出现种植转移。Kodera *et al*^[6]报道在腹腔内有FCC的10例患者中, 8例术后发生腹腔种植转移; 而在无FCC的81例患者中, 只有2例术后发生腹腔种植转移。

2 CHPPC的理论基础

2.1 IPC的药代动力学优势 (1) 局部提供大容积高浓度的化疗液。业已证明区域化疗优于其它给药方法, 在肿瘤部位直接提高抗癌药浓度, 使腹腔游离癌细胞和术后残存的微小癌灶直接浸泡在高浓度的抗癌药液中, 从而增加抗癌药对肿瘤细胞的杀伤能力而不增加甚至减少或避免对全身的毒副作用。(2) 抗癌药对肿瘤细胞的毒性作用不仅取决于其本身, 而且与其接触肿瘤细胞的浓度和持续时间即药物浓度时间曲线下的面积(area under curve, AUC)有关。抗癌药在体循环内的清除率较高, 而腹腔内给药, 代谢较慢, 高药物浓度保持时间较长, Sugarbaker *et al*^[7]报告, 顺铂(DDP)、丝裂霉素(MMC)、5-氟脲嘧啶(5-FU)等药物腹腔内给药时腹腔与血浆浓度时间曲线下面积比(AUC ratio)高达7.8, 23.5, 250。

池丽芬 *et al*^[8]研究发现用DDP行CHPPC时, 虽然血浆DDP浓度峰值低于静脉用药组, 但下降慢, 2 h后已高于静脉用药组AUC反而较高. (3)经门静脉系转移入肝被认为是大肠癌最主要的转移途径, IPC时, 绝大多数抗癌药经门脉系吸收入肝, 也使转移至肝脏的癌细胞受到高浓度抗癌药的攻击. (4)大多数抗癌药腹腔化疗具有高选择性区域化疗药代动力学特点, 能在腹腔液内、门静脉血和肝中提供恒定持久高浓度的抗癌药, 仅极少量药进入体循环, 全身毒副作用小. (5)IPC时腹腔内最常见复发转移的解剖部位直接与高浓度的抗癌药接触, 有利于防止局部复发和转移. (6)IPC提供了探索试管内某些抗肿瘤药物协同作用临床合适浓度的机会, 这些有效的浓度常超越全身所能承受的浓度. (7)IPC时抗癌药可与中和剂合用能减少体循环毒性, 产生最大限度药物剂量耐受性, 改善疗效指数.

2.2 热疗对肿瘤细胞的杀伤作用 正常组织细胞在高温条件下能耐受47℃持续1 h; 而恶性肿瘤细胞仅能耐受43℃持续1 h, 43℃持续1 h被称为恶性肿瘤细胞不可逆损害的临界温度. 目前有关热疗对肿瘤细胞杀伤作用的解释有^[9]: (1)热疗产生肿瘤坏死因子对细胞凋亡起促进作用. (2)热疗使肿瘤细胞内溶酶体活性增加, 进而崩解释放消化酶损伤细胞. (3)在高温下, 肿瘤细胞DNA受损, 其修补的聚合酶活性下降, DNA损伤修补受阻, 加速其凋亡. (4)热疗可导致肿瘤组织血管扩张, 使肿瘤细胞处于缺氧、低葡萄糖、低pH值的营养不良状态, 同时抑制肿瘤新生血管的形成, 从而损伤肿瘤细胞.

2.3 热疗与化疗的协同作用 基础实验和临床应用均已表明加热可增强多种化疗药的抗癌作用: (1)热动力学效应加快化疗药与癌靶细胞相结合, 其活性大大增强, 从而提高癌细胞对某些抗癌药的反应率; (2)热疗增加某些抗癌药与肿瘤细胞DNA交联, 增强杀伤肿瘤细胞效应; (3)腹腔加热后大容量化疗能增加肿瘤细胞对抗癌药的敏感性; (4)热疗可增加癌细胞的通透性, 使化疗药能有效渗入癌细胞内, 充分发挥其抗癌作用. 与热疗有协同效应的抗癌药物包括5-FU、MMC、DDP、TNF- α 、白介素-1 α (IL-1 α)、血管生成抑制剂(angio genesis inhibitors)、博来霉素(bleomycin)、阿霉素(doxorubicin)、碳铂(carboplatin)、依立替康(irinotecan)、异磷酰胺(ifosfamide)、二氟脱氧胞嘧啶核苷(gemcitabine)、长春碱(vinblastine)^[10].

2.4 CHPPC流体动力学优势 (1)大容量腹腔持续灌注通过机械冲刷作用清除腹腔内残留的癌细胞. (2)因高温的化疗液不断冲刷, 术野内渗出的纤维蛋白难以形成保护癌细胞的纤维素样凝固物隔离层, 有利于机体免疫活性细胞吞噬消灭恶性肿瘤细胞.

3 CHPPC的实施

3.1 仪器 目前CHPPC常用仪器有NK-1单电脑型热灌注化疗机和RHL-2000A型热化疗灌注机, 其装置基本由加热水温箱、热交换器、可调转速(流量)灌注泵、电子测温传感器和热灌注导管系统所组成.

3.2 化疗药物的选择 除本身抗肿瘤的效果外, CHPPC抗癌药物的选择还要考虑 (1)药物的腹膜渗透性低; (2)药物对腹腔肿瘤的穿透力较强; (3)药物与热疗有协同作用; (4)药物毒性较小、腹膜刺激性较小. 目前临床上应用较多的化疗药物有MMC、5-FU、DDP和ADR(阿霉素)等^[7].

3.3 操作方法

3.3.1 腹腔灌注 手术切除胃肠恶性肿瘤后在盆腔和左右上腹腔分别各放置一条内径为0.8 cm, 外径为1 cm的硅胶导管, 分别从腹壁戳口引出. 关腹后机器与引流管连接, 将已加热到43-45℃的灌注液通过热疗机经盆腔导管灌入, 并分别在输入端和引流端导管置热探头测温传感器监控入温和出温, 调控机器控温装置使入温、出温分别保持在43-44℃、41-42℃. 灌注量一般为2 000 mL, 灌注速度为200-500 mL/min, 循环灌注时间为1 h. 灌注后引流管接引流袋或负压引流瓶, 以备术后灌注化疗用.

3.3.2 盆腔灌注 适用于直肠癌无腹膜和肝转移者. 切除病灶后在盆腔置两条硅胶导管, 一条从腹部切口引出, 另一条从会阴切口引出, 缝闭会阴切口. 导管与热化疗机相连, 余同腹腔灌注, 灌注化疗后关腹.

3.4 CHPPC实施时机^[11] 临床经验表明, CHPPC最好在术中、术后早期进行, 此时行CHPPC的优势有: (1)切除部位和手术损伤的腹膜表面在术后最易发生癌细胞种植复发; (2)如果术中彻底分离了黏连并在腹腔黏连形成之前行CHPPC, 所有腹膜表面都能充分与化疗液相接触; (3)此时患者体内肿瘤负荷最小, 肿瘤细胞分裂、增殖速度加快, 对抗癌药敏感; (4)3-5 d后, 腹腔黏连形成可导致管路不通畅, 患者在治疗过程中易腹痛、腹胀而拒绝或不能接受治疗; (5)在手

■同行评价

本文就胃肠癌术后腹腔复发转移机制, CHPPC的理论基础、实施的时机方法及抗癌疗效等进行较全面系统的综述, 层次分明、文笔流畅、内容新颖, 对临床实践有积极指导价值.

术康复期间就完成了治疗,既节省住院时间,又花费少。

3.5 CHPPC的适应证和禁忌证^[11,12]

3.5.1 适应证 (1)预防性CHPPC适于有浆膜浸润但无腹膜弥散转移可行根治术的胃肠癌;(2)治疗性CHPPC适于有浆膜浸润并已有腹膜弥散转移的进展期胃肠癌,也适于已有弥散至腹膜的亚临床微小转移癌结节,仅能行姑息切除手术者;(3)手术后腹腔内多发转移者,结合再次手术应用。

3.5.2 禁忌证 (1)严重的心血管疾病患者;(2)明显肝肾功能不全患者;(3)卡氏评分60分以下者。

4 CHPPC的抗癌疗效

临床应用表明手术联合CHPPC能较好地防治胃肠癌术后复发,提高生存率。国内外近年相关临床研究主要有,张刚庆 *et al*^[13]将50例胃癌患者随机分成热灌注化疗组和非热灌注化疗组,研究发现两组3 a死亡率差异无显著性意义 ($P>0.05$),但两组术前病变已浸透浆膜和/或已有腹腔内转移者比较,2 a时病死率、3 a时病死率、2 a时复发率与3 a时复发率差异均有显著意义 (P 均 <0.05);刘松龄 *et al*^[14]将126例中晚期胃肠恶性肿瘤患者术后随机分成腹腔热灌注化疗组和静脉化疗组,结果发现热灌注化疗组3 a以上生存率显著高于对照组 ($P<0.05$),腹腔内复发、肝转移率显著低于对照组 ($P<0.05$);孙君军 *et al*^[15]选行规范根治术的胃肠癌患者70例,随机分为术后腹腔内热灌注化疗组和全身化疗组,每组35人,发现热灌注化疗组出现的毒副反应人数和程度都较对照组少且轻,术后3, 5 a的生存率均高于对照组,差异有显著性意义 ($P<0.05$);Kecmanovic *et al*^[16]对其所在单位1996/2003行细胞减积术并行围手术期CHPPC的结直肠癌的病例做回顾性分析,结果术后病死率为44.4%,无治疗相关性死亡,并发现手术并行CHPPC可延长患者的生存时间;Hall *et al*^[17]最近做了一项关于细胞减积术联合腹腔热化疗治疗进展期胃癌的随机对照研究,34例有腹腔转移的胃癌患者行细胞减积性胃切除术并腹腔热化疗,对照组为40例同期患者行胃癌根治术严格按照肿瘤治疗原则进行淋巴结清扫,结果表明尽管行腹腔热化疗组病情较对照组严重,但仍获得与后者相似的总体生存率;Schmidt *et al*^[18]对67例行完全细胞减积术和CHPPC的腹腔

肿瘤患者进行分析并用欧洲癌症治疗研究组织(EORTC) QLQ-C30调查表做生活质量调查,结果为总体病死率为34%,术后病死率为4.5%;长期存活者的全球健康状况平均得分为62.6(对照人群为73.3, $P=0.07$),发现通过这种治疗可以提高患者的生存质量,改善预后。这些临床研究表明CHPPC能较为有效地防治胃肠癌术后腹腔内复发,提高患者的生存率及生存质量。

5 CHPPC的毒副作用和并发症

CHPPC主要副作用和并发症有骨髓抑制、吻合口瘘、肠穿孔、急性肾衰竭、黏连性肠梗阻、化学性腹膜炎等。另外热疗可能附带的一个缺点是诱导多重耐药基因(multidrug-resistant gene, MDRI)的表达,然而临床应用表明这种危险是微乎其微的^[19]。Fujimura *et al*^[20]报道22例胃癌患者术后行CHPPC,发生骨髓抑制4例,急性肾功能衰竭2例,肠黏连和吻合口瘘各1例。Yonemura *et al*^[21]研究发现于CHPPC后发生的骨髓抑制,肝功能受损均于2 wk左右恢复正常。Chung *et al*^[22]报告一例老年胃癌患者术中行CHPPC时出现致命性的室性心率失常,但经过及时心肺复苏、适当补液、纠正电解质紊乱和复温后,患者心肺功能恢复正常。孙君军 *et al*^[15]报道经腹腔热灌注化疗的35例胃癌患者术后均未出现吻合口瘘、腹腔感染、切口裂开,也未出现与灌注有关的肠麻痹、肠黏连等情况;灌注前后肝、肾功能各项指标均在正常范围内;体温在术后和灌注期间为38℃左右,持续 10.9 ± 3.1 d均恢复正常,红、白细胞计数与术前比较在灌注后第2 wk略有下降 ($P>0.05$),但血小板由手术前的 $(140\pm 81)\times 10^9/L$ 降为 $(128\pm 90)\times 10^9/L$,差异有显著性意义 ($P<0.05$),至第3 wk已恢复到术前水平 ($P>0.05$)。以上研究结果表明CHPPC后体温升高,红细胞、白细胞、血小板计数改变,肝、肾功能损害,为一过性的,其毒副作用小,并发症少,随着方法的改进和技术的不断改善,有些并发症是完全可以防止的。

总之,腹腔热灌注化疗具有明显的抗癌机制和药代动力学优势,有效杀灭腹腔内游离癌细胞,消除残存较小癌灶,能较为有效地防治胃肠癌术后腹腔复发和肝转移,提高生存率、生存质量,是一种安全、操作方便实用、毒副作用小、并发症少、可重复应用的有效治疗方法,是目前胃肠道恶性肿瘤较为合理的外科辅助治疗,可能将成为治疗胃肠肿瘤不可或缺的方法。

6 参考文献

- 1 Fujimoto S, Shrestha RD, Kokubun M, Ohta M, Takahashi M, Kobayashi K, Kiuchi S, Okui K, Miyoshi T, Arimizu N. Intraperitoneal hyperthermic perfusion combined with surgery effective for gastric cancer patients with peritoneal seeding. *Ann Surg* 1988; 208: 36-41
- 2 Ikeguchi M, Oka A, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Relationship between area of serosal invasion and intraperitoneal free cancer cells in patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 1994; 14: 2131-2134
- 3 Baskaranathan S, Philips J, McCredde P, Solomon MJ. Free colorectal cancer cells on the peritoneal surface: correlation with pathologic variables and survival. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 2076-2079
- 4 Marutsuka T, Shimada S, Shiomori K, Hayashi N, Yagi Y, Yamane T, Ogawa M. Mechanisms of peritoneal metastasis after operation for non-serosa-invasive gastric carcinoma: an ultrarapid detection system for intraperitoneal free cancer cells and a prophylactic strategy for peritoneal metastasis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 678-685
- 5 Sayfan J, Averbuch F, Koltun L, Benyamin N. Effect of rectal stump washout on the presence of free malignant cells in the rectum during anterior resection for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1710-1712
- 6 Kodera Y, Yamamura Y, Shimizu Y, Torii A, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T. Peritoneal washing cytology: prognostic value of positive findings in patients with gastric carcinoma undergoing a potentially curative resection. *J Surg Oncol* 1999; 72: 60-64
- 7 Sugarbaker PH, Mora JT, Carmignani P, Stuart OA, Yoo D. Update on chemotherapeutic agents utilized for perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Oncologist* 2005; 10: 112-122
- 8 池丽芬, 李民驹, 汤谷平. 顺铂腹腔热灌注化疗与其他用药方式药代动力学比较. *实用肿瘤杂志* 2000; 15: 179-181
- 9 李鼎九, 张珊文. 哺乳动物加温后细胞分子水平. 见: 李鼎九, 胡自省, 钟毓斌. *肿瘤热疗学*. 第2版. 郑州: 郑州大学出版社, 2003: 25-34
- 10 Ceelen WP, Hesse U, de Hemptinne B, Pattyn P. Hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion in the treatment of locally advanced intra-abdominal cancer. *Br J Surg* 2000; 87: 1006-1015
- 11 尹春柱, 张强. 胃肠道恶性肿瘤术后早期腹腔热灌注化疗. *实用肿瘤学杂志* 2004; 18: 155-157
- 12 卿三华. 进展期胃癌手术联合腹腔热灌注化疗. *临床外科杂志* 1999; 7: 2-4
- 13 张刚庆, 卿三华, 齐德林, 周正端, 王红兵. 腹腔或盆腔热灌注化疗的胃癌癌临床研究50例. *中华普通外科杂志* 2001; 16: 737-739
- 14 刘松龄, 张宁, 宋启明, 宋启明, 孙国峰. 中晚期胃肠恶性肿瘤术后腹腔温热灌注化疗的临床研究. *中国综合临床* 2001; 17: 616-617
- 15 孙君军, 丁雅芳, 张广平, 朱天伦. 腹腔热灌注化疗在胃癌治疗中的应用研究. *肿瘤* 2004; 24: 67-68
- 16 Kecmanovic DM, Pavlov MJ, Ceranic MS, Sepetkovski AV, Kovacevic PA, Stamenkovic AB. Treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer by cytoreductive surgery and hyperthermic perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 147-152
- 17 Hall JJ, Loggie BW, Shen P, Beamer S, Douglas Case L, McQuellon R, Geisinger KR, Levine EA. Cytoreductive surgery with intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for advanced gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 454-463
- 18 Schmidt U, Dahlke MH, Klempnauer J, Schlitt HJ, Piso P. Perioperative morbidity and quality of life in long term survivors following cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 53-58
- 19 Stein U, Rau B, Wust P, Walther W, Schlag PM. Hyperthermia for treatment of rectal cancer: evaluation for induction of multidrug resistance gene (mdr1) expression. *Int J Cancer* 1999; 80: 5-12
- 20 Fujimura T, Yonemura Y, Muraoka K, Takamura H, Hirono Y, Sahara H, Ninomiya I, Matsumoto H, Tsugawa K, Nishimura G. Continuous hyperthermic peritoneal perfusion for the prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer: randomized controlled study. *World J Surg* 1994; 18: 150-155
- 21 Yonemura Y, Ninomiya I, Kaji M, Sugiyama K, Fujimura K, Sawa T, Katayama K, Tanaka S, Hirono Y, Miwa K. Prophylaxis with intraoperative chemohyperthermia against peritoneal recurrence of serosal invasion-positive gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19: 450-454
- 22 Chung NC, Liu YC, Ye XD, Wang YM, Kuo MC, Liu K. Fatal arrhythmia following intraoperative continuous hyperthermic peritoneal perfusion chemotherapy. *Acta Anaesthesiol Sin* 2003; 41: 201-204

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

胃癌 TIMP3 基因启动子甲基化及其蛋白表达的研究

关志宇, 戴冬秋

■背景资料

虽然目前已经发现了一些肿瘤抑制基因的改变,但是癌发展的分子机制还不是很清楚。异常CpG岛甲基化在各种肿瘤中都可以被发现,并与基因的失活存在密切关系。

关志宇, 戴冬秋, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001

关志宇, 男, 1969-08-20生, 辽宁省鞍山市人, 2003年中国医科大学肿瘤外科博士生, 副主任医师, 主要从事胃肠癌转移分子机制与临床应用研究。

国家自然科学基金项目, No. 30271477

教育部留学回国人员科研启动基金项目, No. 2002-247

通讯作者: 戴冬秋, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科, 辽宁省胃癌分子病理重点实验室。daidq63@163.com

电话: 024-23256666-6227, 6228

收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-09-30

Promoter methylation and expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene in gastric cancer

Guan Zhi-Yu, Dai Dong-Qiu

Guan Zhi-Yu, Dai Dong-Qiu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, 110001, Liaoning Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271477, and the Scientific Research Foundation of Education Ministry for the Returned Overseas Chinese Scholars, No.2002-247

Correspondence to: Dr. Dong-Qiu Dai, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing Beijie, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. daidq63@163.com

Received: 2005-09-28 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To analyze the relations among the aberrant methylation of the promoter CpG islands of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3) gene, its protein expression, and the clinicopathological features of gastric adenocarcinoma.

METHODS: The methylation status of promoter CpG islands and protein expression of TIMP3 gene in the tumors and the adjacent normal mucosal tissues of 78 patients with gastric adenocarcinoma were detected by methylation-specific PCR (MSP) and immunohistochemistry respectively.

RESULTS: The CpG island methylation of TIMP3 was detected in tumour tissues, cancer-adjacent tissues and lymph node with metastasis. In increasing order of frequency, the hypermeth-

ylation rates of these tissues were 35.9% (28 of 78 non-neoplastic tissues), 85% (17 of 20 early-stage cases), 89.7% (52 of 58 progression-stage cases), and 100% (78 of 78 metastasis lymph node), respectively, and there was marked difference between cancerous and non-cancerous tissues ($P < 0.05$). However, there were no significant differences among subgroups of tumor tissues ($P > 0.05$). Immunohistochemistry analysis confirmed TIMP3 down-regulation in tumor tissues. The rate of TIMP3 gene expression in non-neoplastic tissues was 100%, while in tumour tissues, it decreased dramatically: in early-stage cancer, it decreased to 30% (6/20); in progression stage, it was 3.4% (2/58); and in metastasis lymph node, it was 0% (0/78). Of 70 tumor tissues with negative TIMP3 expression, 64 (91.4%) were hypermethylated and 6 (8.6%) were unmethylated, indicating that there were significant association between hypermethylation and reduced or negative TIMP3 expression ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The hypermethylation of promoter region in CpG islands is a main mechanism of reduced and loss expression of TIMP3 gene, and it may provide an evidence for molecular diagnosis and stage evaluation of gastric cancer.

Key Words: Gastric adenocarcinoma; Tissue inhibitor of metalloproteinase 3; CpG island; Methylation

Guan ZY, Dai DQ. Promoter methylation and expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):138-143

摘要

目的: 探讨组织金属蛋白酶抑制因子-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3, TIMP3) 基因启动子甲基化与其蛋白表达的相关性, 并分析 TIMP3 基因 CpG 岛异常甲基化与胃腺癌及其临床病理特征的关联性。

方法: 应用甲基化特异性 PCR (MSP) 技术和免疫组织化学方法分别检测 78 例患者的胃正常黏膜组织、胃癌组织及转移淋巴结中, TIMP3

基因启动子甲基化和蛋白表达情况。

结果:胃正常黏膜组织、早期、进展期胃癌组织和转移淋巴结中TIMP3基因启动子均有甲基化修饰,其阳性率分别为35.9%(28/78); 85.0%(17/20), 89.7%(52/58); 转移淋巴结100%(78/78)。胃癌组TIMP3基因启动子甲基化率明显高于胃正常黏膜组($P<0.05$)。胃正常黏膜组织TIMP3蛋白表达全部为阳性(100%), 20例早期胃癌中, 6例阳性(30%), 58例进展期胃癌中, 2例阳性(3.4%), 在转移淋巴结中全部不表达(0%)。胃癌70例蛋白表达阴性的标本中, 64例TIMP3基因启动子甲基化阳性(91.4%), TIMP3蛋白表达与启动子甲基化呈明显负相关($P<0.01$)。

结论:启动子区CpG岛高甲基化是胃癌组织中TIMP3基因表达失活的主要机制,可能成为胃癌分子诊断与病期评估的标志之一。

关键词: 胃癌; TIMP3; CpG岛; 甲基化

关志宇, 戴冬秋. 胃癌TIMP3基因启动子甲基化及其蛋白表达的研究. 世界华人消化杂志 2006;14(2):138-143
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/138.asp>

0 引言

胃癌(gastric carcinoma)是全世界最常见的恶性肿瘤之一,其发生发展是一个多基因参与的多阶段过程。这些因素最终在不同阶段作用于不同基因,引起相关基因的结构及表达水平改变,导致胃癌的发生发展。抑癌基因功能的丢失可能通过多种途径,目前普遍认为DNA异常甲基化改变是除缺失与突变之外导致抑癌基因表达失活的第3种机制^[1,2]。在肿瘤的发生发展中起着不可忽视的作用。管家基因上游启动子区含有丰富的CpG序列,称为CpG岛,通常情况下,这些部位的胞嘧啶不发生甲基化,但在一些因素的刺激下发生甲基化而使其表达受到抑制^[3]。目前发现很多肿瘤相关基因的失活都与其启动子区的甲基化有关,如p16, THBS1, TIMP3, hMLH1, MGMT等^[4-8]。组织金属蛋白酶抑制因子-3(tissue inhibitor of metalloproteinase-3, TIMP3)拮抗基质金属蛋白酶的活性,抑制肿瘤的生长、血管形成、浸润和转移, TIMP3的失活与肿瘤的发生有关^[9]。我们应用甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)技术和免疫组织化学方法分别检测78例胃癌患者的胃正常黏膜组织、胃癌

组织和转移淋巴结中TIMP3基因启动子CpG岛甲基化和蛋白表达情况,探讨其基因启动子甲基化与其蛋白表达的相关性,并分析TIMP3基因CpG岛异常甲基化与胃腺癌及其临床病理特征的关联性。

1 材料和方法

1.1 材料 1998-03/2005-05中国医科大学附属第一医院及辽宁省肿瘤医院胃癌患者术后胃正常组织、胃癌组织和转移淋巴结78例,经病理确定诊断,按国际抗癌联盟新TNM分期标准、中国医科大学肿瘤研究所胃癌生长方式分型及日本胃癌处理规约分期、分型^[10-12]。男54例,女24例,平均年龄 56.2 ± 7.5 岁,早期胃癌20例,进展期胃癌58例;分化型44例,未分化型14例。10 mmol/L hydroquinone和3.9 mol/L sodium bisulfite购自Sigma公司; DNA Clean-up System购自Promega公司; TIMP3抗体及SP试剂盒购自大连博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 甲基化特异性PCR(MSP) 采用甲基化特异性PCR方法^[13],甲基化酶处理的和未处理的正常人的外周血细胞分别为阳性和阴性对照。甲基化(TIMP3-M)和非甲基化(TIMP3-U)引物, TIMP3-M引物序列为: 5'-CGT TTCGTTATTTTGTGTTTTCGGTTTTTC-3'和5'-CCGAAAACCCCGCCTCG-3'; TIMP3-U引物序列为: 5'-TTTTGTGTTTGTAT TTTTGTGTTTGTGTTT-3'和5'-CCCCCAAAAACCCACCTCA-3'。反应条件: 95℃预变性5 min后, 95℃变性30 s, 59℃退火60 s, 72℃延伸60 s, 40个循环, 72℃再延伸10 min, 琼脂糖凝胶电泳, EB染色。结果经激光密度扫描仪(Pharmacia LKB Ul troscan)采集数据,分析电泳结果。实验重复三次,取其平均值进行统计分析。

1.2.2 免疫组织化学 采用链霉菌抗生素蛋白一过氧化酶染色法,免疫组化染色步骤按说明书进行。判定标准:染色后细胞质呈棕黄色为阳性,以正常组织染色区域为阳性对照,以PBS代替一抗的正常切片为阴性对照。积分标准参照 Shimizu *et al*^[14]法:高倍镜下观察染色强度和阳性细胞分布范围分别积分,无染色者为0分,染色弱但明显强于阴性对照者为1分,染色清晰者为2分,染色强者为3分;无阳性细胞者为0分,阳性细胞数<30%者为1分, 30%-60%者为2分, >60%者为3分,按积分之和进行评定。≤2分为

■研究前沿

表遗传学研究的对象是基因表达的变化,这种变化可通过减数分裂遗传,但不涉及有关基因DNA序列的改变,通过DNA自身化学修饰方式从转录水平影响基因的表达,调控DNA功能,此机制在肿瘤的形成过程中越来越受到重视。

■创新盘点

DNA甲基化是当今肿瘤研究的热点,其中许多内在机制尚待深入研究.本研究是肿瘤抑制基因在胃癌组织及其癌旁组织的甲基化表达水平的对比研究,揭示其甲基化与胃癌生物学行为的关系.

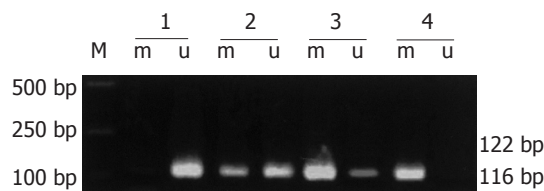


图1 甲基化特异性PCR(MSP). 1: 正常对照(胃正常组织); 2: 早期胃癌; 3: 进展期胃癌; 4: 转移淋巴结.

表1 胃癌组织TIMP3启动子甲基化与蛋白表达 n (%)

组织	n	TIMP3启动子甲基化	TIMP3蛋白表达
		阳性	阳性
正常胃	78	28 (35.9)	78 (100.0)
早期胃癌	20	17 (85.0)	9 (45.0)
进展期胃癌	58	52 (89.7)	21 (36.2)
转移淋巴结	78	77 (98.7)	12 (15.4)

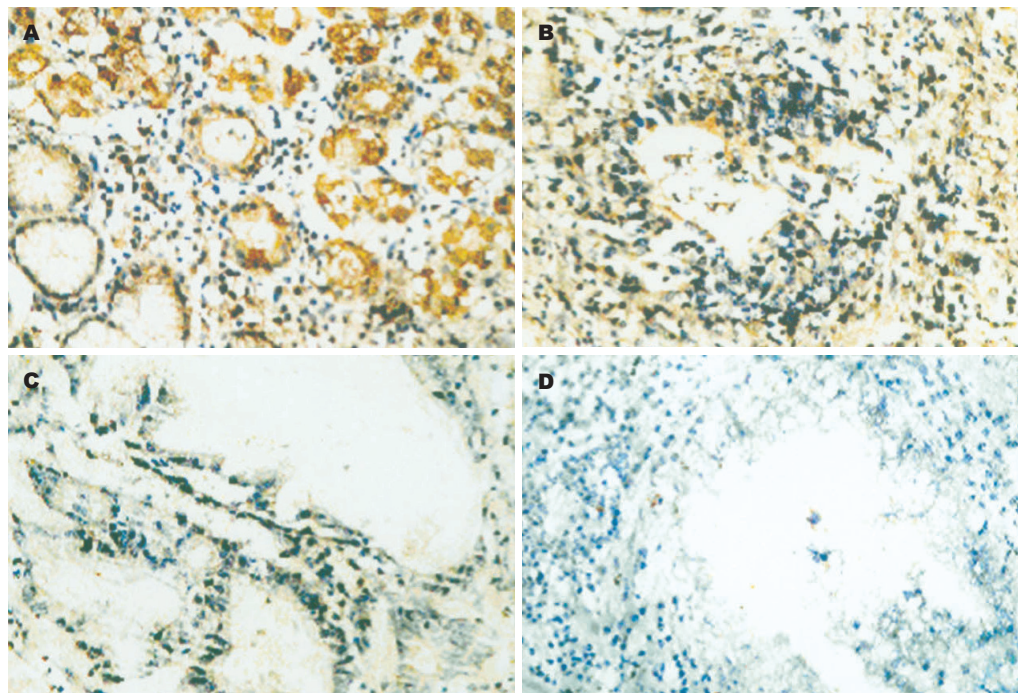


图2 TIMP3 蛋白免疫组化染色结果(SP × 400). A: 正常胃组织; B: 早期胃癌 C: 进展期胃癌; D 转移淋巴结.

TIMP3表达阴性, 3分为弱阳性, 4-5分为阳性, 6分为强阳性.

统计学处理 以 χ^2 及Fisher精确检验分析不同研究对象间TIMP3基因启动子甲基化率和蛋白表达的差异. 采用SPSS12统计软件包分析.

2 结果

2.1 TIMP3 基因启动子甲基化分析 以研究对象基因组DNA为模板, 经MSP扩增后, 其甲基化和非甲基化扩增产物分别为116 bp和122 bp. 胃正常组织、胃癌组织和转移淋巴结中TIMP3基因启动子均存在甲基化修饰现象, 其检出的阳性率分别为: 早期胃癌85% (17/20)、进展期胃癌89.7% (52/58)及转移淋巴结98.7% (77/78), 而胃正常组织则仅为35.9% (28/78), 经统计学检验, 胃癌各组与胃正常组织比较均有非常显著的意义 ($P < 0.01$, 图1, 表1), 提示胃癌及转移淋巴结组织中, TIMP3甲基化率升高, 该基因甲基化可能

参与胃癌的发生和转移.

2.2 TIMP3蛋白表达的免疫组化分析 78例胃正常组织TIMP3蛋白表达全部为阳性(100%), 胃癌组织中, 20例早期胃癌中9例阳性, 11例阴性(55%); 58例进展期胃癌中21例阳性, 37例阴性(63.8%), 78例转移淋巴结中阳性12, 阴性66(84.6%), 经统计学检验, 胃癌各组与胃正常组织比较均有非常显著的意义 ($P < 0.01$, 图2, 表1), 提示胃癌及转移淋巴结组织中, TIMP3蛋白表达率降低, 该基因蛋白表达可能由于TIMP3甲基化导致蛋白表达下降. 正常腺体TIMP3蛋白表达主要位于细胞质, 个别细胞可见细胞膜有少量表达(图2A), 腺体结构无破坏, 着色没有明显减弱; 早期胃癌腺体结构破坏, 癌细胞着色很弱; 进展期胃癌癌组织呈大的实性片块状生长(未分化癌), 除个别细胞着色外其余均不着色.

2.3 TIMP3基因启动子甲基化及其蛋白表达的关系 进展期胃癌中, 弥漫状生长组织TIMP3甲

表 2 进展期胃癌病理学与TIMP3甲基化及其蛋白表达量的关系 *n* (%)

指标	<i>n</i>	TIMP3启动子甲基化	TIMP3蛋白表达
肿瘤大小: (cm)	<5	5	3 (60.0)
	5-10	45	42 (93.3)
	>10	8	7 (87.5)
大体类型:	Borr.2	12	10 (83.3)
	Borr.3	37	33 (89.2)
	Borr.4	9	9 (100.0)
组织学:	分化型	44	39 (88.6)
	未分化型	14	13 (92.9)
生长方式:	团块+巢状	27	21 (77.8)
	弥漫状	31	31 (100.0) ^b
淋巴结转移:	<7	36	30 (83.3)
	≥7	22	22 (100.0) ^a
浸润:	黏膜下, 肌层	6	3 (50.0)
	浆膜下	23	21 (91.3) ^a
	透浆膜	29	28 (96.6)

■应用要点
本文研究了DNA甲基化与基因表达的关系及作用机制, 有利于肿瘤发病机制的研究及指导临床治疗.

^a *P*<0.05, ^b *P*<0.01.

甲基化率明显高于团块状和巢状生长组织(100% *vs* 77.8%, *P*< 0.01); 转移淋巴结大于7个(包括7个)的组织中TIMP3甲基化率明显高于少于7个的组织(100% *vs* 83.3%, *P*<0.05); 浆膜下和透浆膜组织中TIMP3甲基化率明显高于黏膜下和肌层组织(91.3%和96.6% *vs* 50%, *P*<0.05), 提示TIMP3基因甲基化率升高以弥漫状生长, 转移淋巴结多(≥7个), 浆膜下和透浆膜的肿瘤多见, 与肿瘤大小、大体类型和组织学类型无关. 在58例进展期胃癌组织中, TIMP3蛋白表达阳性率为36.2%(21), 团块状和巢状生长组织TIMP3蛋白表达明显高于弥漫状生长组织(55.6% *vs* 19.4% , *P*<0.01); 转移淋巴结少于7个的组织TIMP3蛋白表达明显高于大于7个(包括7个)的组织(47.2% *vs* 18.2%, *P*<0.05), 提示TIMP3蛋白表达率下降以弥漫状生长, 转移淋巴结多(≥7个)的肿瘤多见, 与肿瘤大小、大体类型、组织学类型和浸润深度无关(表2).

3 讨论

恶性肿瘤为多因素、多阶段形成, 其生物学特性表现为浸润生长和转移, 其发生机制在于细胞内部基因结构和功能发生了异常改变. 现代肿瘤理论认为, 在肿瘤的形成过程中包含两大类机制, 一个是遗传学层面, 即通过DNA核苷酸序列改变而形成突变; 另一个就是表遗传学(epigenetics)层面, 其研究的对象是基因表达的变化, 这种变化可通过减数分裂遗传, 但不涉及有关基因DNA序列的改变, 通过DNA自身化学修饰方式从转录水平影响基因的表达, 调控DNA功能, 此机制在肿瘤的形成过程中越来越

受到重视^[15,16]. 肿瘤组织DNA常常发生其启动子区域的异常甲基化, 包括与细胞增殖周期密切相关的癌基因低甲基化和抑癌基因高甲基化改变, 这些异常甲基化改变一方面可激活癌基因^[17-19], 另一方面可使抑癌基因由于5'端启动子调控区CpG岛异常高甲基化而抑制mRNA转录作用^[20], 导致该基因的失活. TIMPs家族有4个成员(TIMP1, 2, 3, 4), 其中TIMP1, 2, 4为可溶性分泌蛋白, TIMP3是与细胞外基质(ECM)结合的非可溶性蛋白, 位于细胞外膜上^[21], 并能紧密连结基底膜, 抑制TNF-α转换酶而通过稳定细胞膜表面TNF-α受体诱导程序性死亡^[22], 其诱导细胞凋亡功能依赖两条途径: 依赖MMP和非依赖MMP途径. TIMP3, 4虽然与MMP-2有高度亲和力和, 却能有效抑制MT1-MMP激活MMP-2酶原的过程, 以抑制肿瘤细胞的生长及转移. Smith *et al*^[23]发现表达TIMP3的人结肠癌细胞株处于有丝分裂期的极少, 均被阻滞于G1期, 但当存在肿瘤坏死因子α(TNF-α)抗体时作用下降70%.

为探讨抑癌基因TIMP3与胃癌的关系及其在胃癌中的灭活机制, 我们检测了正常胃黏膜组织、胃癌组织及转移淋巴结中TIMP3基因5'端CpG岛异常甲基化的情况. 结果发现, 85%以上的各期胃癌有TIMP3基因5'端CpG岛异常甲基化现象, 与正常胃组织相比有显著性差异(*P*<0.01), 证明TIMP3基因启动子CpG岛甲基化是该基因表达缺失的主要原因, 也是其在胃癌中的主要灭活机制. Gagnon *et al*^[24]报道在所有TIMP3 mRNA表达缺失、TIMP3基因的启动子CpG岛均为甲基化的MCF-7肺癌细胞株中, 应用5-AZA-CdR诱导TIMP3基因去甲基化后, 进行诱

■同行评价

本研究立意新颖,指标先进,方法切实可行,有一定先进性和科学性,并且能够结合中国医科大学附属第一医院多年胃癌研究和临床工作的优势进行研究,也有实际意义。

导前后的RT-PCR检测,发现TIMP3基因重新表达,与本研究结果相同。本结果提示,78例正常胃组织中TIMP3蛋白全部表达阳性,而甲基化阳性表达为28例(35.9%);20例早期胃癌中TIMP3蛋白表达9例阳性,甲基化阳性表达为17例(85%);58例进展期胃癌中TIMP3蛋白表达21例阳性,甲基化阳性表达为52例(89.7%);78例转移淋巴结中TIMP3蛋白表达阳性12,甲基化阳性表达为77例(98.7%),早期癌、进展期癌和转移淋巴结与正常组织甲基化率的差异均有显著性($P<0.01$),证实了TIMP3蛋白表达缺失与该基因启动子CpG岛甲基化密切相关。Feng *et al*^[25]报道在对绒毛膜癌细胞系JAR和JEG-3研究中有相同结果,证明TIMP3基因启动子CpG岛甲基化是该基因蛋白表达缺失的主要原因。在进展期胃癌标本中,52例TIMP3启动子CpG岛发生甲基化,蛋白表达21例,提示除启动子CpG岛甲基化以外,一些其他的因素如基因变异,也可引起该基因表达缺失。在本实验中出现第34号标本甲基化和未甲基化均为阳性,通常解释为:该基因可能存在不完全甲基化状况;肿瘤组织中混杂的非肿瘤细胞,经MSP(用未甲基化引物)扩增后,也可有阳性产物。该标本TIMP3蛋白表达为阴性,因此,此标本应该定义为甲基化阳性。Kerbel^[26]报道,具有转移潜能的亚克隆瘤细胞在原发癌灶发生的早期即具有生长优势,这种生长优势是由于转移性亚克隆细胞群体可分泌某种特殊因子或对局部细胞生长因子具有特殊反应而呈现的选择性生长所致。所以,检测原发肿瘤标本中某些肿瘤分子标志的水平有可能反应出整个肿瘤的一般转移特性。本组的胃正常组织仅为35.9%,早期癌和进展期癌的甲基化率升高(85%和89.7%),淋巴结的甲基化率为98.7%;均匀一致的TIMP3蛋白强阳性表达仅存在于胃正常组织,而早期、进展期胃癌仅见局灶性弱阳性表达,转移淋巴结几乎没有阳性表达。上述结果提示TIMP3发生甲基化随着肿瘤的进展逐步升高,其蛋白表达逐渐下降,具有转移潜能而在生长中逐渐占据优势并发生转移。Yegnasubramanian *et al*^[27]报道,使用real-time MSP对前列腺癌细胞系、73例早期前列腺癌、91例转移前列腺癌和25例前列腺非癌组织进行研究发现,肿瘤的转移与TIMP3甲基化的表达相关,并因此推测CpG甲基化与前列腺癌的分级和进展有关,这一事实提示TIMP3基因甲基化在转移过程中起着重要作用。据此,作者认为,TIMP3 CpG甲基化的检

测在预测原发肿瘤的转移潜能方面具有一定的实用价值。

TIMP3在人的众多类型的恶性肿瘤中有高频率的变异,包括突变、缺失、甲基化、染色体易位等^[28],这些变异导致该基因的正常抑制细胞增殖的功能丧失(即灭活或失活),并与癌的发生发展密切相关^[29]。但TIMP3基因在原发性胃癌中的变异情况却报道较少,并且缺失率较低,没有发现突变的存在,提示可能TIMP3基因在胃癌组织中有其他的失活机制^[30]。由此可见,肿瘤发病机制的复杂性已不仅体现在由基因突变或缺失导致的遗传改变,还表现在以DNA甲基化为代表的表遗传学改变,深入研究DNA甲基化与基因表达的关系及作用机制将有利于肿瘤发病机制的研究及指导临床治疗。

4 参考文献

- 1 Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21(WAF1) regulation. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 400-405
- 2 Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001; 234: 10-20
- 3 Kimura N, Nagasaka T, Murakami J, Sasamoto H, Murakami M, Tanaka N, Matsubara N. Methylation profiles of genes utilizing newly developed CpG island methylation microarray on colorectal cancer patients. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e46
- 4 Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest* 2004; 84: 884-893
- 5 Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163: 1551-1556
- 6 Oue N, Matsumura S, Nakayama H, Kitadai Y, Taniyama K, Matsusaki K, Yasui W. Reduced expression of the TSP1 gene and its association with promoter hypermethylation in gastric carcinoma. *Oncology* 2003; 64: 423-429
- 7 Xue WC, Chan KY, Feng HC, Chiu PM, Ngan HY, Tsao SW, Cheung AN. Promoter hypermethylation of multiple genes in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *J Mol Diagn* 2004; 6: 326-334
- 8 Kim H, Kim YH, Kim SE, Kim NG, Noh SH, Kim H. Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16INK4A, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2003; 200: 23-31
- 9 Lindsey JC, Lusher ME, Anderton JA, Bailey S, Gilbertson RJ, Pearson AD, Ellison DW, Clifford SC. Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling. *Carcinogenesis* 2004; 25: 661-668
- 10 Sobin LH, Fleming ID. TNM classification of malignant tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee

- on Cancer. *Cancer* 1997; 80: 1803-1804
- 11 Zhang WF, Chen JQ, Shan JX, Wang ZS, Qi CL, Chen ZH, Wang SB, Liang HW. Indication of radical surgery (R2, R3) based upon the pattern of lymph node metastasis from gastric cancer. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1987; 9: 286-289
- 12 日本胃癌学会. 胃癌取り扱い規約. 第13版. 东京: 金原出版 1993: 8
- 13 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826
- 14 Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol* 1990; 21: 607-612
- 15 Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M. Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 2000; 408: 495-498
- 16 Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001; 234: 10-20
- 17 Suter CM, Norrie M, Ku SL, Cheong KF, Tomlinson I, Ward RL. CpG island methylation is a common finding in colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2003; 88: 413-419
- 18 Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-174
- 19 Colot V, Maloisel L, Rossignol JL. DNA repeats and homologous recombination: a probable role for DNA methylation in genome stability of eukaryotic cells. *J Soc Biol* 1999; 193: 29-34
- 20 Kaneda A, Kaminishi M, Yanagihara K, Sugimura T, Ushijima T. Identification of silencing of nine genes in human gastric cancers. *Cancer Res* 2002; 62: 6645-6650
- 21 Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KL, Poole AR, Wakeham A, Mak TW, Khokha R. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 2001; 108: 817-829
- 22 Mannello F, Gazzanelli G. Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis* 2001; 6: 479-482
- 23 Smith MR, Kung H, Durum SK, Colburn NH, Sun Y. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* 1997; 9: 770-780
- 24 Gagnon J, Shaker S, Primeau M, Hurtubise A, Momparler RL. Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide on antineoplastic activity and activation of 14-3-3sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 2003; 14: 193-202
- 25 Feng H, Cheung AN, Xue WC, Wang Y, Wang X, Fu S, Wang Q, Ngan HY, Tsao SW. Down-regulation and promoter methylation of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in choriocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 375-382
- 26 Kerbel RS. Growth dominance of the metastatic cancer cell: cellular and molecular aspects. *Adv Cancer Res* 1990; 55: 87-132
- 27 Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 1975-1986
- 28 Lee S, Lee HJ, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2003; 163: 1371-1378
- 29 Galm O, Rountree MR, Bachman KE, Jair KW, Baylin SB, Herman JG. Enzymatic regional methylation assay: a novel method to quantify regional CpG methylation density. *Genome Res* 2002; 12: 153-157
- 30 Kang GH, Lee S, Shim YH, Kim JC, Ro JY. Profile of methylated CpG sites of hMLH1 promoter in primary gastric carcinoma with microsatellite instability. *Pathol Int* 2002; 52: 764-768

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

温热体外对人胃癌细胞株生物学行为的影响

汤睿, 朱正纲, 瞿颖, 李建芳, 纪玉宝, 刘炳亚, 燕敏, 林言箴

■背景资料

热疗是一古老的肿瘤治法, 近年一些肿瘤的体外研究发现, 短时温热能杀伤肿瘤细胞, 目前的研究热点集中在温热作用机制及与其他手段的联合应用上(可阅文献3, 15, 17等).

汤睿, 朱正纲, 瞿颖, 李建芳, 纪玉宝, 刘炳亚, 燕敏, 林言箴, 上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海消化外科研究所 上海市 200025

汤睿, 上海交通大学医学院附属第九人民医院普外科 上海市 200011

汤睿, 1972-08-04生, 上海市人, 汉族, 2000年上海第二医科大学硕士毕业, 2003级上海交通大学医学院博士生, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤综合治疗的临床与基础研究.

上海市科委课题资助项目, No. 044119625

上海市医学重点学科建设课题资助项目, No. 05 III 005

通讯作者: 朱正纲, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学医学院、上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科, 上海消化外科研究所. zzg1954@hotmail.com

电话: 021-64370045-611003 传真: 021-64373909

收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2005-10-31

Impact of hyperthermia on human gastric cancer cell lines *in vitro*

Rui Tang, Zheng-Gang Zhu, Ying Qu, Jian-Fang Li, Yu-Bao Ji, Bing-Ya Liu, Min Yan, Yan-Zhen Lin

Rui Tang, Zheng-Gang Zhu, Ying Qu, Jian-Fang Li, Yu-Bao Ji, Bing-Ya Liu, Min Yan, Yan-Zhen Lin, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Rui Tang, Department of General Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China

Supported by the Science and Technology Committee Foundation of Shanghai, No. 044119625; and the Foundation of Key Medical Academic Discipline of Shanghai, No. 05 III 005

Correspondence to: Professor Zheng-Gang Zhu, Department of General Surgery, Ruijin Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University; Shanghai Institute of Digestive Surgery, 197 Ruijin Er Road, Shanghai 200025, China. zzg1954@hotmail.com

Received: 2005-10-14 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To investigate the impact of hyperthermia (HT) on human gastric cell lines *in vitro*.

METHODS: Six human gastric cancer cell lines (AGS, MKN45, SGC7901, NCI-N87, SNU-1 and SNU-16) were used in this study. HT was achieved by incubating cells at 43 °C for 2 h, and cells incubated at 37 °C served as normothermia (NT) control. MTT assay was adopted to evaluate cell proliferation and cytotoxicity after HT. The preliminary morphological changes were

observed by light microscopy (LM) and fluorescent microscopy (FM) while the ultrastructure changes and the specific cell death styles were determined by transmission electron microscopy (TEM). Flow cytometry (FCM) was used for further quantitatively analysis of the proportion of apoptosis and necrosis after an annexin V-FITC and PI double staining. Adhesion and invasion test *in vitro* was also adopted in this study to evaluate the impact of HT on cells' adhesive and invasive ability.

RESULTS: According to the data of MTT, HT inhibited proliferation of SNU-1 cells significantly ($P < 0.05$), while it had no marked proliferation inhibition effect on SNU-16 cells ($P > 0.05$). For the other four adherent cell lines, HT only inhibited cell proliferation temporarily (d1-d2, $P < 0.05$). LM found that HT had no cell-killing effect on most of gastric cancer cell lines except SNU-1. FM and TEM indicated there were no significant morphological changes of AGS cells at 24 h after HT treatment, while apoptosis and necrosis appeared in SNU-1 cells. FCM showed that HT therapy did not increase spontaneous mortality rate of AGS cell ($t = 0.45$, $P = 0.678$ 8), but raised apoptotic and necrotic rate of SNU-1 (mortality rate from $9.71 \pm 1.14\%$ of NT to $20.05 \pm 2.49\%$ of HT, $t = 6.54$, $P = 0.002$ 8). Adhesion test indicated that HT reduced adhesive ability of four adherent cell lines (AGS: $t = 4.86$, $P = 0.008$ 3; MKN45: $t = 4.50$, $P = 0.010$ 8; SGC7901: $t = 6.83$, $P = 0.002$ 4; N87: $t = 4.16$, $P = 0.014$ 1). Invasion test also illustrated that HT decreased adhesive ability of all six cell lines (AGS: $t = 2.94$, $P = 0.042$ 5; MKN45: $t = 3.60$, $P = 0.022$ 7; SGC7901: $t = 4.70$, $P = 0.009$ 3; N87: $t = 12.41$, $P = 0.000$ 2; SNU-1: $t = 3.63$, $P = 0.022$ 2; SNU-16: $t = 4.13$, $P = 0.014$ 5).

CONCLUSION: Most of gastric cancer cell lines used in our study is thermotolerant to time-limited HT therapy. HT can temporarily inhibit cell proliferation while had no cell-killing effect on most of gastric cancer cell lines. SNU-1 is an exception, and HT can induce both apoptosis and necrosis. In addition, HT can reduce cancer cells' adhesiveness and invasiveness.

Key Words: Hyperthermia; Gastric cancer cell line

关键词: 温热; 胃癌细胞株

Tang R, Zhu ZG, Qu Y, Li JF, Ji YB, Liu BY, Yan M, Lin YZ. Impact of hyperthermia on human gastric cancer cell lines *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):144-151

汤睿, 朱正纲, 瞿颖, 李建芳, 纪玉宝, 刘炳亚, 燕敏, 林言箴. 温热体外对人胃癌细胞株生物学行为的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(2):144-151

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/144.asp>

摘要

目的: 探讨温热对人胃癌细胞株增殖、生存以及黏附、侵袭能力的影响。

方法: 对人胃癌细胞株(AGS, MKN45, SGC7901, NCI-N87, SNU-1和SNU-16)行43℃ 2 h的温热处理, 以37℃常温培养为对照。处理后用MTT法绘制生长曲线并比较增殖抑制情况; 光镜下动态观察细胞生长情况和形态学变化; Hoechst33342/PI荧光染色观察细胞核染色等形态学变化; 透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察细胞超微结构和死亡的具体形式; 流式细胞术(flow cytometry, FCM)定量分析细胞的凋亡和坏死比例; 黏附和侵袭试验观察胃癌细胞的黏附和侵袭能力。

结果: MTT提示, 温热对SNU-1有显著的增殖抑制作用($P < 0.01$), 对SNU-16则无显著影响($P > 0.05$), 对4株贴壁细胞则表现为暂时性的增殖抑制(d1-d2, $P < 0.05$); 光镜观察发现温热处理后SNU-1细胞出现死亡, 而其他细胞无; 荧光染色和透射电镜未发现AGS在温热处理后24 h有显著的形态学改变, 而SNU-1则出现凋亡和坏死; FCM提示温热处理不增加AGS的自然死亡率($t = 0.45$, $P = 0.678$), 但能诱导SNU-1发生凋亡和坏死, 增加细胞死亡率($9.7\% \pm 1.1\%$ vs $20.1\% \pm 2.5\%$, $t = 6.54$, $P = 0.002$); 黏附试验表明温热能不同程度降低4株贴壁细胞的黏附能力[AGS($t = 4.86$, $P = 0.008$), MKN45($t = 4.50$, $P = 0.010$), SGC7901($t = 6.83$, $P = 0.002$), N87($t = 4.16$, $P = 0.014$)]; 侵袭试验表明温热能不同程度降低6株细胞的侵袭能力[AGS($t = 2.94$, $P = 0.042$), MKN45($t = 3.60$, $P = 0.022$), SGC7901($t = 4.70$, $P = 0.009$), N87($t = 12.41$, $P = 0.000$), SNU-1($t = 3.63$, $P = 0.022$), SNU-16($t = 4.13$, $P = 0.014$)]。

结论: 大多数的胃癌细胞株表现对短时间温热的耐受, 除了暂时性的增殖抑制作用外, 温热并无细胞杀伤作用, SNU-1是一个例外, 温热能导致SNU-1细胞的凋亡和坏死; 同时, 温热处理能降低细胞的黏附和侵袭能力。

0 引言

热疗是最古老的肿瘤治疗方式之一, 现代医学也证实热疗对一些肿瘤具有治疗效果, 临床上也常作为一种辅助手段与放化疗等结合应用^[1-4]。在胃癌的治疗中, 腹腔内温热化疗对防治胃癌腹膜转移复发具有较好的疗效^[5-8]。与微波或高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)等^[9]治疗实质性脏器肿瘤不同的是: 治疗胃癌这类空腔脏器肿瘤采用的非高热而是43℃左右的温热, 其可能机制要比高热直接杀伤肿瘤细胞复杂得多, 在胃癌方面, 有关的研究报道很少, 且与临床实际条件不一致^[10-14]。因此我们采用了临床有效且相对安全的43℃作为温热的条件, 在体外较为系统地观察了温热对胃癌细胞生物学行为的影响, 为临床应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株AGS(ATCC Number: CRL-1739), MKN45, SGC7901, NCI-N87(CRL-5822), SNU-1(CRL-5971), SNU-16(CRL-5974)由瑞金医院上海消化外科研究所传代培养保存。含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液(Gibco), 37℃, 50 mL/L CO₂饱和湿度条件下传代培养, 选用对数生长期细胞进行实验。

1.2 方法 温热(HT)处理时温度为43℃, 常温(NT)为37℃, 温控由CO₂细胞培养箱实现, 误差±0.1℃, 细胞均放置于50 mL/L CO₂饱和湿度条件下, 温热处理时间为2 h。

1.2.1 细胞毒和增殖抑制试验(MTT法) 收集对数生长期的胃癌细胞均匀接种96孔板, 每孔细胞数量 $1-2 \times 10^3$, 体积200 μL, 37℃, 50 mL/L CO₂培养24 h后进行温热处理, 非温热处理组作为常温对照, 同时设不加细胞的背景对照, 处理后继续常规培养。到达时间设定点时每孔加入5 g/L MTT 20 μL, 37℃孵育4 h, 使MTT还原为甲臃; 离心弃上清, 每孔加入DMSO 150 μL; 水平摇床37℃振荡5 min, 紫色结晶充分溶解混匀后, 应用酶标仪(μQuant, Bio-Tek)于波长570 nm检测吸光度A值, 扣除背景对照的A₅₇₀值即代表

■创新盘点

胃癌的现代治疗中, 腹腔内温热化疗对防治胃癌腹膜转移具良好疗效, 但基础研究很少, 且与临床条件不一致。本研究模拟了临床温热的条件, 在体外较系统地观察了温热对胃癌细胞生物学行为的影响, 发现大多数胃癌细胞株能够耐受43℃ 2 h的短时温热, 但其黏附和侵袭能力有所降低, 提示了临床应用的可能机制, 也说明了治疗胃癌温热仍需与其他手段联合使用。

■名词解释

温热(Hyperthermia): 热疗在临床实践中可通过各种方法实现局部或全身升温, 通常将温度42℃-45℃的热处理称为温热, 临床上多与放疗化疗等其他手段联合应用。

存活细胞数量. 分别测量处理后24, 48, 72, 96和120 h的 A_{570} 值, 制作细胞生长曲线; 并比较HT与NT时的细胞毒和增殖抑制情况(将常温对照组的值固定为1, 温热组取其 A 值与常温对照组 A 值之比). 每个细胞每次实验的两组各设置5-6个复孔, 重复3-4次. 上述胃癌细胞还分别在处理后不同时间点于倒置显微镜(Olympus IX70)下观察细胞生长、活力和形态变化并拍照.

1.2.2 Hoechst 33342/PI荧光染色 AGS和SNU-1, 处理后继续培养24 h, 收集细胞, 细胞悬液中加入Hoechst 33342(终浓度5 μ g/L), 37℃孵育15 min; 离心弃上清并重悬细胞, 加入PI(终浓度1-2 mg/L), 4℃染色10 min; 离心弃上清, 调整细胞浓度至 5×10^8 /L; 取细胞悬液50 mL, 500 r/min离心5 min制成甩片; 10 g/L多聚甲醛固定, 4℃ 5 min; 蒸馏水冲洗后拭干; 荧光显微镜(Olympus U-SPT)紫外和绿光下读片并拍照, 观察细胞形态结构及胞核的变化, 整个过程避光. 结果评判标准: 正常细胞胞核为Hoechst(HO)蓝色淡染, 浓染或成颗粒状为阳性, 正常细胞PI拒染, 染色即为阳性. 因此, HO(-)/PI (-)为活细胞; HO(+)/PI (-)为凋亡细胞; PI(+)为坏死细胞.

1.2.3 透射电镜观察细胞死亡形式 AGS和SNU-1, 约 2.5×10^6 接种于75 cm^2 培养瓶内, 24 h后温热处理, 处理后继续培养24 h, 收集细胞, 制备透射电镜样本, 步骤如下: 20 g/L戊二醛PBS固定液4℃前固定2 h; PBS缓冲液4℃漂洗二次, 每次10 min; 10 g/L锇酸PBS固定液4℃后固定2 h; 乙醇逐级脱水, 每次10 min, 700 mL/L乙醇(含30 g/L醋酸双氧铀)4℃块染, 乙醇逐级脱水, 每次10 min; 环氧丙烷置换2次, 每次10 min; 618包埋液与环氧丙烷1:1 2 h, 618包埋液与环氧丙烷2:1过夜, 纯618包埋液37℃浸透6 h; 60℃烘箱内包埋48 h; LVB V型超薄切片机切片; 枸橼酸铅电子染色; 样本制备完成后, HITACHI H-500或PHILIP CM-120透射电镜观察并摄片.

1.2.4 流式细胞术定量分析细胞凋亡和坏死比例 AGS和SNU-1, 六孔板中每孔约 $4-6 \times 10^4$ 铺板, 铺板24 h后处理, 处理后继续培养24 h检测收集细胞, 采用Annexin V-FITC Apoptosis Kit(BD), 染色步骤, 详见操作手册, 染色后送流式(FACS-Calibur, BD)检测分析. 结果判断标准: 双变量流式细胞仪所测得的散点图中, 左下象限为活细胞, 表现为Annexin-/PI-; 右下象限为早期凋亡细胞, 表现为Annexin+/PI-; 右上象限为晚期凋亡和坏死细胞, 表现为Annexin+/PI+; 左上象限为

死亡细胞, 表现为Annexin-/PI+. 以上温热或常温处理均为3复孔, 最后结果为3复孔的均值.

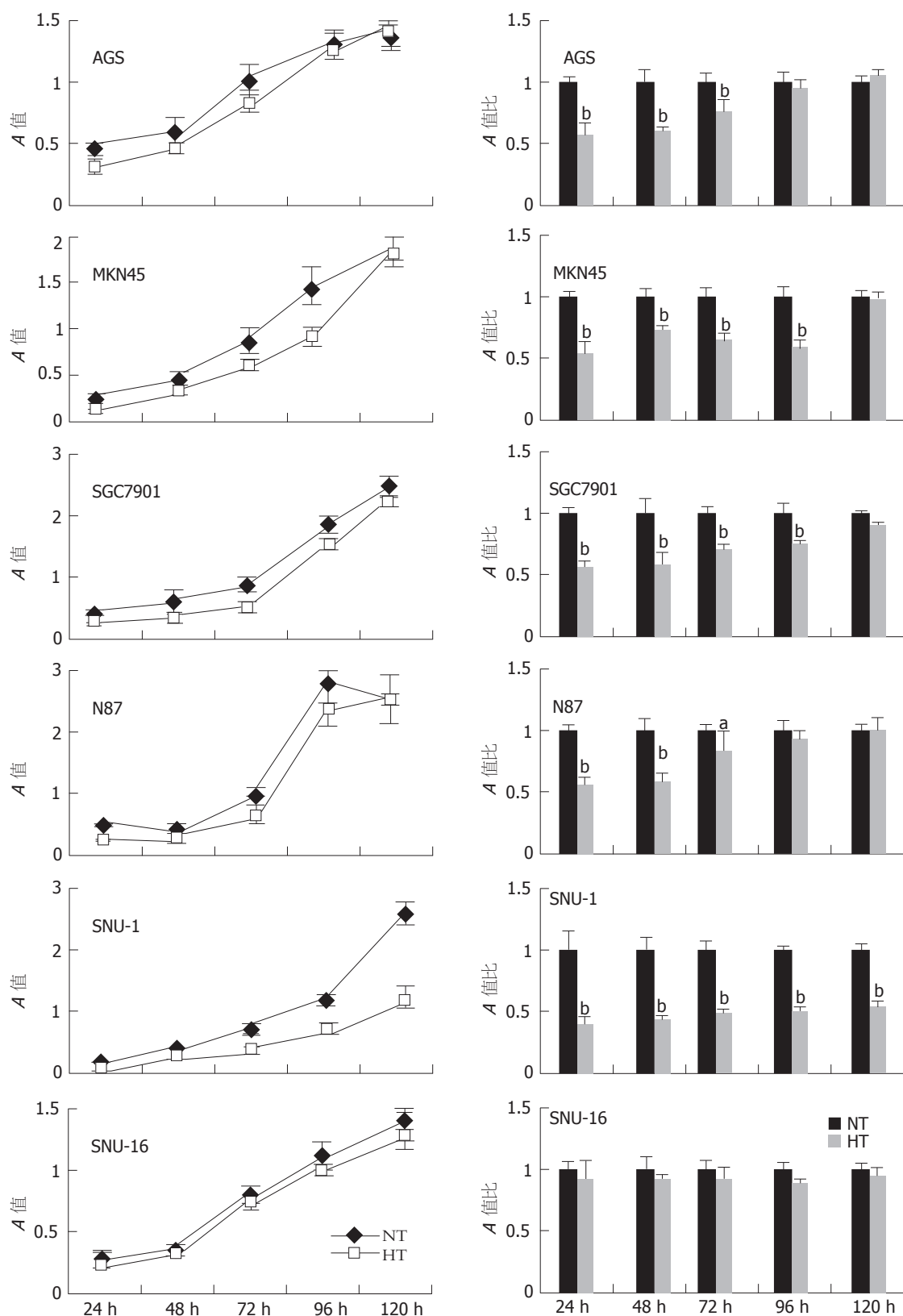
1.2.5 黏附和侵袭试验 黏附试验采用Chemicon公司黏附试验试剂盒(CytoMatrix™ cell adhesion strips, ECM 105), 评价细胞对细胞外基质主要成分IV胶原的黏附能力, 具体步骤详见操作手册. 侵袭试验采用Chemicon公司侵袭试验试剂盒(QCM™ cell invasion assay, ECM 555), 试剂盒依据Boyden小室原理, 上室底部有8 μ m孔径膜, 膜上覆盖有细胞外基质, 通过荧光染色检测穿过细胞外基质和8 μ m孔到达膜背面的细胞数量, 评价细胞的侵袭能力, 具体步骤详见操作手册.

统计学处理 计量数据采用mean \pm SD表示, 温热与对照两组间的比较采用 t 检验, 统计分析由SAS统计软件包(v6.12)完成, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 温热对胃癌细胞株增殖和存活的影响 SNU-1对温热处理最为敏感, 温热组与对照组 A 值的比值始终在50%以下; SNU-16耐热, 两组的生长曲线基本重合, 温热组与常温对照组 A 值的比值始终在90%以上; 对其他细胞的增殖则存在一定影响, 但其增殖抑制作用有一定时限, 随时间延长而消失, 至温热处理后120 h, 温热组的 A 值都接近甚至超过常温对照组(图1). 光镜可见AGS细胞, 温热处理后24-96 h细胞呈现一定程度的增殖抑制, 细胞密度低于常温对照组, 至120 h细胞密度与对照组的差别已缩小, 除温热处理后24 h内有少量的细胞变圆、脱壁以外, 形态与常温对照组无明显不同(图2), 其余3株贴壁细胞的情况与AGS类似; 悬浮细胞SNU-16温热处理后无明显外观形态变化, 而SNU-1较为特殊, 温热处理后24 h即可见到细胞死亡现象(图3). 荧光染色与透射电镜均未见温热对AGS有显著形态学影响, 也无明显的细胞死亡; 对于SNU-1, 温热处理能引起细胞死亡, 死亡形式包括凋亡和坏死(图4, 图5). 流式分析提示: 单纯温热并不增加AGS细胞的死亡率($10.4\% \pm 1.0\%$ vs $10.0\% \pm 1.2\%$, $t = 0.45$, $P = 0.678$), 但可增加SNU-1细胞的死亡率($9.7\% \pm 1.1\%$ vs $20.1\% \pm 2.5\%$, $t = 6.54$, $P = 0.002$), 凋亡和坏死各占一定比例(图6).

2.2 温热对胃癌细胞黏附和侵袭能力的影响 4株贴壁细胞温热处理后黏附能力均呈现不同程度的降低(图7A), 与常温对照比较, 分别为


 图 1 温热对各胃癌细胞株增殖的影响. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

AGS($100\% \pm 9.0\%$ vs $69.3\% \pm 10.0\%$, $t = 4.86$, $P = 0.0083$), MKN45($100\% \pm 2.9\%$ vs $90.0\% \pm 2.5\%$, $t = 4.50$, $P = 0.0108$), SGC7901($100\% \pm 4.8\%$ vs $65.6\% \pm 7.3\%$, $t = 6.83$, $P = 0.0024$),

N87($100\% \pm 0.8\%$ vs $78.8\% \pm 10.4\%$, $t = 4.16$, $P = 0.0141$). 所有6株细胞温热处理后侵袭能力均呈现不同程度的降低(图7B), 与常温对照比较, 分别为AGS($100\% \pm 7.1\%$ vs $85.2\% \pm 5.1\%$,

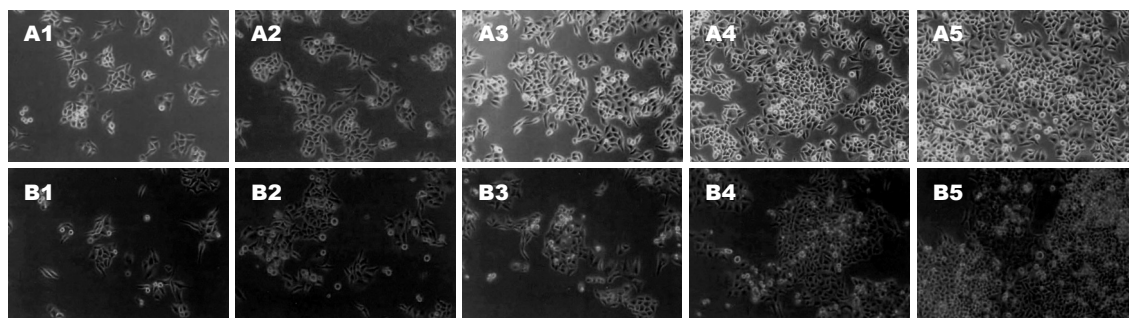


图 2 温热处理对AGS细胞的影响 (倒置显微镜 $\times 100$). A1-A5: NT, d 1-d 5; B1-B5: HT, d 1-d 5.

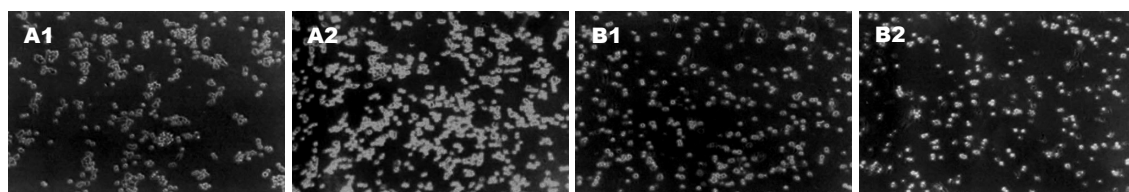


图 3 温热处理对SNU-1细胞的影响 (倒置显微镜 $\times 100$). A1-A2: NT, d 1-d 2; B1-B2: HT, d 1-d 2.

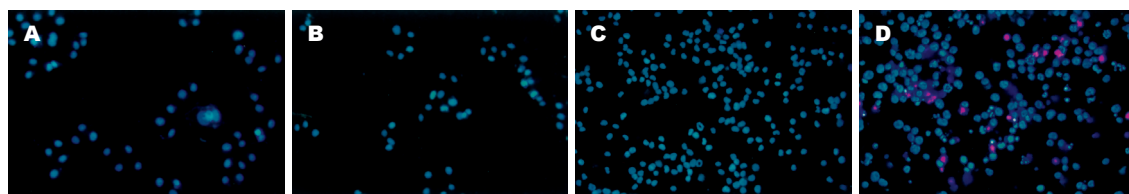


图 4 温热处理对胃癌细胞株AGS和SNU-1的影响 (荧光显微镜 $\times 200$). A: AGS, NT; B: AGS, HT; C: SNU-1, NT; D: SNU-1, HT.

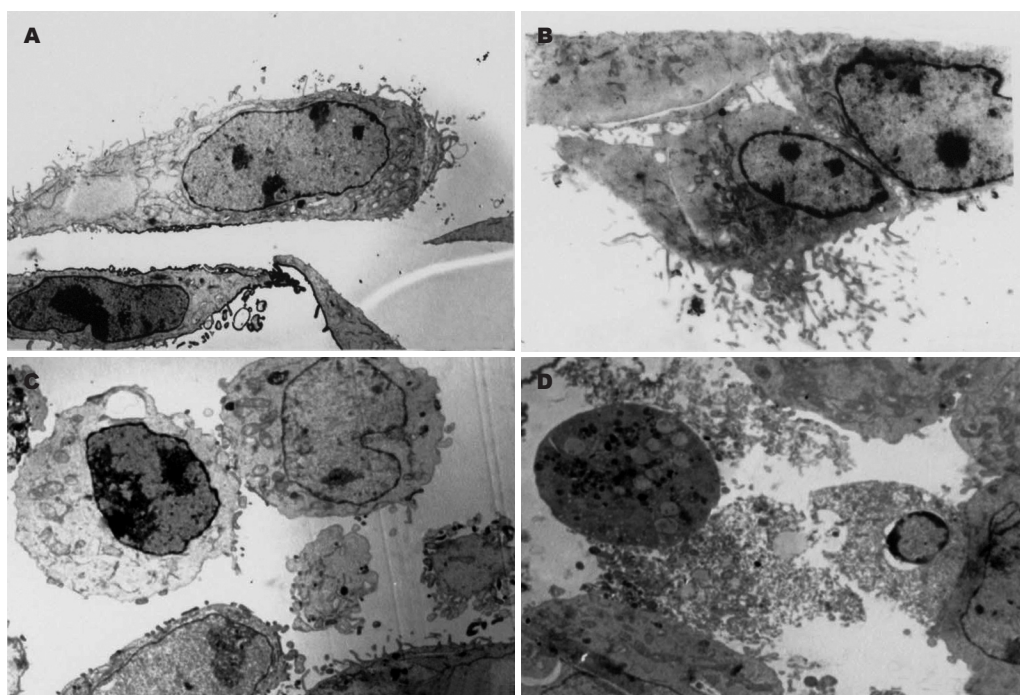


图 5 温热处理后胃癌细胞株AGS和SNU-1的透射电镜观察. Bar AGS 5 μm , SNU-1 10 μm . A: AGS, NT; B: AGS, HT; C: SNU-1, NT; D: SNU-1, HT.

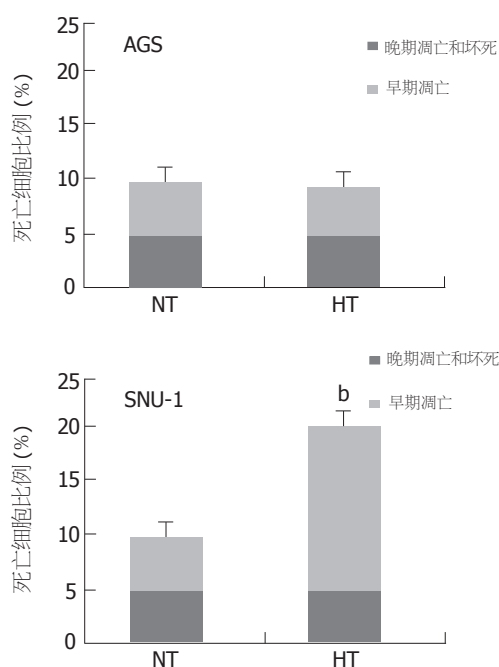


图 6 温热处理后AGS和SNU-1死亡细胞比例. 标准差为死亡细胞总和的标准差, $^bP<0.01$.

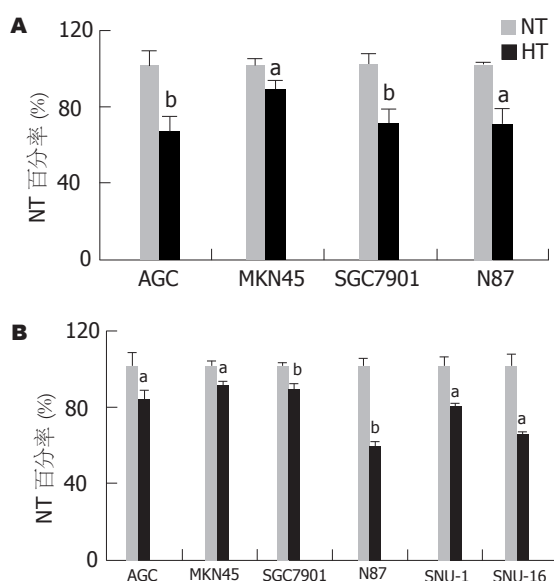


图 7 温热处理对胃癌细胞黏附和侵袭能力的影响. HT vs NT: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$. A: 黏附能力; B: 侵袭能力.

$t = 2.94$, $P = 0.0425$), MKN45($100\% \pm 2.6\%$ vs $91.6\% \pm 3.1\%$, $t = 3.60$, $P = 0.0227$), SGC7901($100\% \pm 1.1\%$ vs $87.9\% \pm 4.3\%$, $t = 4.70$, $P = 0.0093$), N87($100\% \pm 4.8\%$ vs $59.9\% \pm 3.0\%$, $t = 12.41$, $P = 0.0002$), SNU-1($100\% \pm 9.1\%$ vs $80.3\% \pm 2.4\%$, $t = 3.63$, $P = 0.0222$), SNU-16($100\% \pm 10.0\%$ vs $74.9\% \pm 1.7\%$, $t = 4.13$, $P = 0.0145$).

3 讨论

一些肿瘤的体外研究发现, 较短时间的温热处

理即能杀伤肿瘤细胞^[15-21]. 对于胃癌, Buell *et al*^[10]报道持续2 h的42.5℃-43.5℃温热处理能够杀伤SNU-5细胞; 而Shchepotin *et al*^[11]则报道连续4 d, 每天持续1 h的42℃温热处理不能够杀伤AGS细胞且对细胞增殖无明显影响; Goto *et al*^[12]应用46℃对MKN28、MKN74和KATO-III三株胃癌细胞进行15、30或60 min的热处理, 结果发现60 min热处理导致细胞坏死而15或30 min的热处理主要诱导细胞凋亡, 各株细胞的凋亡率略有差异; 在国内, 杨耀琴 *et al*^[13]未发现100 min 42℃的温热处理能杀伤BGC-823细胞, 陈卫星 *et al*^[14]则报道43℃ 30 min的热处理即能诱导MKN28细胞发生凋亡. 可以看出, 以上研究结果并不一致, 可能与应用的细胞株以及温热处理与临床条件不同有关. 因此我们共选择了6株国内外较为常用的细胞, 包括了不同分化程度、不同病灶来源和不同生长方式的胃癌细胞株, 以期从整体上了解温热对胃癌细胞的影响. 同时模拟了临床腹腔内温热化疗的作用温度和时间, 43℃ 2 h, 并在温热处理后作了较长时间的动态观察. 出乎意料的是, 在我们的实验条件下, 温热除对SNU-1一株细胞能够产生直接杀伤作用之外, 对其他5株细胞无杀伤作用, 其中对SNU-16基本无影响, 对贴壁细胞只产生了短暂的增殖抑制效应, 说明温热直接杀伤胃癌细胞并非普遍现象, 胃癌细胞似乎相对耐热, 这也提示我们在临床的实际应用中仅用温热处理是不够的, 还是应结合放化疗等其他措施联合治疗. 目前还不了解胃癌细胞与其他肿瘤细胞热敏感差异的具体机制, 可能与不同类型细胞对热的反应和敏感性不同有关. 从近年来的理论进展来看, 温热处理后引起的细胞内部基因和蛋白质的变化也比我们以前认识的要复杂得多. 温热作为一种应激原, 一方面使许多功能基因关闭, 另一方面也诱导一些应激相关基因的开放保护细胞, 如HSP^[2,22], 细胞是否死亡取决于细胞类型和抗凋亡基因的表达情况^[2,22-24].

以往报道温热杀伤肿瘤细胞的形式包括坏死和凋亡两种, 早期认为温热杀伤肿瘤细胞是引起细胞的坏死, 随着凋亡现象的发现和深入研究, 目前更多学者认为温热杀伤肿瘤细胞的机制主要是诱导凋亡^[24]. 比如以往认为温热处理可导致细胞膜的流动性和通透性发生改变, 引起细胞膜起泡等现象, 现认为此改变并非代表温热引起的原发损害, 而是细胞凋亡的典型特征, 胞膜损伤可能是细胞凋亡的继发改变^[25].

当然, 由于研究的细胞类型不同, 进行温热处理的温度和持续时间不同, 不同学者报道的结果也有差异. 尽管如此, 凋亡与坏死在许多病理状态下的界限并不清楚, 也不易完全区分, 能诱导细胞凋亡的大多数刺激如强度或时间延长也能导致细胞死亡^[26]. 从我们的实验结果来看, 43℃ 2 h的温热处理可引起SNU-1肿瘤细胞的坏死和凋亡, 且两种形式均占了一定的比例, 不能完全辨别哪个是主要形式.

腹膜转移是胃癌术后复发的最常见原因. 腹膜转移由腹腔内游离癌细胞着床于腹膜后增殖发展而来, 而手术的挤压以及由切断的血管和淋巴管溢出的癌细胞也是产生游离癌细胞的重要原因之一. 根据腹膜转移的“种子-土壤”学说, 手术创伤使腹膜间皮下组织裸露, 形成所谓的“土壤”, 同时残留的血凝块和创伤修复过程中大量纤维素渗出也有利于保护肿瘤细胞^[27], 是否着床则最终取决于“种子”的能力——即肿瘤细胞的黏附和侵袭能力, 因此胃癌细胞的黏附和侵袭能力是腹膜转移发生的重要原因之一. 我们的实验证实, 多数情况下, 持续2 h的43℃温热不足以杀伤肿瘤细胞, 但通过光镜观察也发现温热作用后有细胞变圆, 伪足减少等变化, 存在影响肿瘤细胞黏附、侵袭能力的可能, 所以我们也对此进行了检测, 结果发现温热处理能够显著降低各株胃癌细胞的黏附和侵袭能力. 既往的有关研究也表明, 温热能使贴壁肿瘤细胞表面的整合素等黏附分子表达降低^[28], 抑制黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的活性, 从而导致黏着斑成分的脱磷酸化和解离、细胞骨架肌动蛋白和微管的解聚, 影响肿瘤细胞的黏附能力和MAKP信号转导通路; 温热能降低uPA表达, 减弱蛋白水解从而抑制肿瘤细胞的浸润和转移^[29]; 也能抑制有关MMP的活性, 增加TIMP的释放, 降低侵袭能力^[30]. 因此胃癌细胞黏附和侵袭能力的降低可能使腹腔内游离癌细胞不能着床, 有利于自身的免疫系统和化疗药物杀伤癌细胞, 从而减少由于手术因素导致的术后腹膜复发.

总之, 单纯温热并不足以防治胃癌腹膜转移的发生, 应与其他手段联合治疗; 但温热能够降低细胞的黏附和侵袭能力, 有利于预防手术导致腹膜转移的发生.

4 参考文献

1 赵世俊, 郭启勇. 肿瘤热疗研究进展. 国外医学·临床

放射学分册 2004; 27: 252-255

- 2 Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 43: 33-56
- 3 Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia* 2001; 17: 1-18
- 4 Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 487-497
- 5 Yonemura Y, de Aretxabala X, Fujimura T, Fushida S, Katayama K, Bandou E, Sugiyama K, Kawamura T, Kinoshita K, Endou Y, Sasaki T. Intraoperative chemohyperthermic peritoneal perfusion as an adjuvant to gastric cancer: final results of a randomized controlled study. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1776-1782
- 6 Fujimoto S, Takahashi M, Mutou T, Kobayashi K, Toyosawa T. Successful intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion for the prevention of postoperative peritoneal recurrence in patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 529-534
- 7 Kuhn JA, McLoughlin JM, Harris DC, Talaasen LJ, Sutton SW, McCarty TM. Intraperitoneal hyperthermic chemotherapy: experience at Baylor University Medical Center. *Proc* 2002; 15: 359-362
- 8 Hirose K, Katayama K, Iida A, Yamaguchi A, Nakagawara G, Umeda S, Kusaka Y. Efficacy of continuous hyperthermic peritoneal perfusion for the prophylaxis and treatment of peritoneal metastasis of advanced gastric cancer: evaluation by multivariate regression analysis. *Oncology* 1999; 57: 106-114
- 9 Kennedy JE, Ter Haar GR, Cranston D. High intensity focused ultrasound: surgery of the future? *Br J Radiol* 2003; 76: 590-599
- 10 Buell JF, Reed E, Lee KB, Parker RJ, Venzon DJ, Amikura K, Arnold S, Fraker DL, Alexander HR. Synergistic effect and possible mechanisms of tumor necrosis factor and cisplatin cytotoxicity under moderate hyperthermia against gastric cancer cells. *Ann Surg Oncol* 1997; 4: 141-148
- 11 Shchepotin IB, Shabahang M, Nauta RJ, Buras RR, Brenner RV, Evans SR. Antitumour activity of 5-fluorouracil, verapamil and hyperthermia against human gastric adenocarcinoma cell (AGS) *in vitro*. *Surg Oncol* 1994; 3: 287-294
- 12 Goto A, Shomori K, Ohkumo T, Tanaka F, Sato K, Ito H. Hyperthermia-induced apoptosis occurs both in a p53 gene-dependent and -independent manner in three human gastric carcinoma cell lines. *Oncol Rep* 1999; 6: 335-339
- 13 杨耀琴, 陈斌, 陶惠红, 杨虎川. 吐温80合并温热诱导BGC-823胃癌细胞凋亡及对Hsp70, Bcl-2和Bax表达的影响. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2002; 11: 306-309
- 14 陈卫星, 顾竹影, 厉有名. 加热诱导人胃癌细胞株MKN28凋亡的动力学研究. *实用癌症杂志* 2001; 16: 126-128
- 15 Choi EK, Park SR, Lee JH, Chung HS, Ahn HE, Rhee YH, Lim BU, Park HJ. Induction of apoptosis by carboplatin and hyperthermia alone or combined in WERI human retinoblastoma cells. *Int J Hyperthermia* 2003; 19: 431-443
- 16 Wan SL, Zhang J, Yang DS, Fan SW. Cytotoxic effect of thermo-chemotherapy with cisplatin on osteosarcoma OS-732 cell line. *Zhejiang Daxue Xuebao*

- Yixueban 2003; 32: 427-432
- 17 Rong Y, Mack P. Apoptosis induced by hyperthermia in Dunn osteosarcoma cell line *in vitro*. *Int J Hyperthermia* 2000; 16: 19-27
- 18 Fuse T, Yoon KW, Kato T, Yamada K. Heat-induced apoptosis in human glioblastoma cell line A172. *Neurosurgery* 1998; 42: 843-849
- 19 Journee-de Korver HG, Midena E, Singh AD. Infrared thermotherapy: from laboratory to clinic. *Ophthalmol Clin North Am* 2005; 18: 99-110
- 20 Han JS, Storck CW, Wachsberger PR, Leeper DB, Berd D, Wahl ML, Coss RA. Acute extracellular acidification increases nuclear associated protein levels in human melanoma cells during 42 degrees C hyperthermia and enhances cell killing. *Int J Hyperthermia* 2002; 18: 404-415
- 21 张炼, 刘仁刚, 周洁萍, 余达经, 刘云华. 加热诱导肝癌细胞系HepA凋亡的研究. *华中科技大学学报(医学版)* 2002; 31: 621-625
- 22 Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004; 101: 227-257
- 23 Falcieri E, Luchetti F, Burattini S, Canonico B, Santi S, Papa S. Lineage-related sensitivity to apoptosis in human tumor cells undergoing hyperthermia. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 135-144
- 24 Honma T. Characteristics of hyperthermia-induced apoptotic cell death. *Nippon Rinsho* 1996; 54: 1949-1954
- 25 Tomasovic SP, Vasey TA, Story MD, Stephens LC, Klostergaard J. Cytotoxic manifestations of the interaction between hyperthermia and TNF: DNA fragmentation. *Int J Hyperthermia* 1994; 10: 247-262
- 26 White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996; 10: 1-15
- 27 丁友成, 朱正纲. 胃肠道肿瘤腹膜转移的基础与临床. *胃肠道肿瘤外科综合治疗新技术* 2002: 317-335
- 28 Luchetti F, Mannello F, Canonico B, Battistelli M, Burattini S, Falcieri E, Papa S. Integrin and cytoskeleton behaviour in human neuroblastoma cells during hyperthermia-related apoptosis. *Apoptosis* 2004; 9: 635-648
- 29 Liang X, Xiao G, Mao Z. The effect of heat shock on the expression of urokinase-type plasminogen activator in human tongue squamous cell carcinoma cell line (Tca8113). *Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi* 2003; 21: 150-152
- 30 Sawaji Y, Sato T, Takeuchi A, Hirata M, Ito A. Anti-angiogenic action of hyperthermia by suppressing gene expression and production of tumour-derived vascular endothelial growth factor *in vivo* and *in vitro*. *Br J Cancer* 2002; 86: 1597-1603

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期8, 18, 28日,页码160,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址:100023 北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社。联系电话:010-85381901-1020;传真:010-85381893;E-mail: wjcd@wjgnet.com;网址: www.wjgnet.com。

中药肝炎平对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠 TGFβ₁/Smad 信号通路的影响

熊章鄂, 但自力, 唐望先, 严红梅

■背景资料

TGFβ₁及其信号转导通路在肝纤维化的发生与发展中有着重要作用, 干预其信号转导的各个环节已成为目前抗肝纤维化治疗的重要目标。

熊章鄂, 但自力, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

唐望先, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030

严红梅, 武汉市第七人民医院肝病科 湖北省武汉市 430071
熊章鄂, 男, 1978-10-09生, 湖北省宜昌市人, 汉族, 2003年华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科硕士生, 主要从事消化系统疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No.30440088

通讯作者: 但自力, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

danzili@msn.com

电话: 027-83663611

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-11-24

Effects of traditional Chinese medicine *Ganyanping* on TGFβ₁/Smad signaling pathway in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis of rats

Zhang-E Xiong, Zi-Li Dan, Wang-Xian Tang, Hong-Mei Yan

Zhang-E Xiong, Zi-Li Dan, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Wang-Xian Tang, Institute of Liver Research, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Hong-Mei Yan, Department of Hepatology, Wuhan Seventh People's Hospital, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.30440088

Correspondence to: Zi-Li Dan, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. danzili@msn.com

Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To study the effects of *Ganyanping* on the experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats, and to explore its anti-fibrotic molecular mechanism.

METHODS: Thirty-eight healthy Wistar rats were randomly divided into normal control (N), model control (A), and *Ganyanping* therapeutic

group (B). The rats in group N was treated with normal saline by intragastrical irrigation, and those in group A and B were subcutaneous injected with CCl₄ to establish hepatic fibrosis model. Four weeks later, the animals in group B were treated with *Ganyanping* (10 μL/g) and those in group A were treated with normal saline by intragastrical irrigation at the same time. The histological changes of the liver tissues were examined by pathological examination. The protein expression of transforming growth factor beta 1 (TGFβ₁) and its receptors (TβR I and TβR II) were measured by immunohistochemical technique. The changes of Smad3, Smad7 and Col1a2 mRNA expression were observed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The levels of TGFβ₁, TβR I, TβR II, Smad3 and Col1a2 expression were elevated, and that of Smad7 was reduced in the model rats. In comparison with those in group A, the levels of TGFβ₁ and its receptors protein expression in group B were significantly decreased after treatment with *Ganyanping* (TGFβ₁: 4.18 ± 0.17 vs 4.30 ± 0.16, *P* < 0.05; TβR I: 4.24 ± 0.10 vs 4.35 ± 0.14, *P* < 0.05; TβR II: 4.27 ± 0.08 vs 4.37 ± 0.11, *P* < 0.05). Meanwhile, the levels of Smad3 and Col1a2 mRNA expression were also down-regulated (Smad3: 0.90 ± 0.41 vs 0.93 ± 0.05, *P* < 0.05; Col1a2: 0.92 ± 0.03 vs 0.95 ± 0.03, *P* < 0.05). However, the level of Smad7 mRNA expression was significantly up-regulated (0.87 ± 0.03 vs 0.84 ± 0.05, *P* < 0.05). The pathological changes of liver tissues in group B were also markedly alleviated.

CONCLUSION: *Ganyanping* has significant inhibitory effects on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats, and its mechanism may be associated with the inhibition of TGFβ₁ and its receptors protein expression, down-regulation of Smad3 mRNA expression and up-regulation of Smad7 mRNA expression.

Key Words: *Ganyanping*; TGFβ₁/Smad signaling pathway; Hepatic fibrosis

Xiong ZE, Dan ZL, Tang WX, Yan HM. Effects of traditional Chinese medicine *Ganyanping* on TGFβ₁/Smad signaling pathway in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):152-157

摘要

目的: 研究中药肝炎平对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化肝脏TGFβ₁及其受体TβR I, TβR II水平和Smad3, Smad7及前胶原α₂(I)(Colla2) mRNA表达的影响, 探讨其抗纤维化的作用机制。

方法: 健康Wistar大鼠38只随机分为正常对照组(N组)、模型对照组(A组)以及肝炎平治疗组(B组)。N组每日以生理盐水10 μL/g灌胃, A组及B组用CCl₄制备大鼠肝纤维化模型, B组4 wk后开始以肝炎平10 μL/g灌胃给药, A组同时以生理盐水10 μL/g灌胃, 每日1次。9 wk后处死大鼠, 取肝组织作病理学检查, 免疫组化检测TGFβ₁及其受体TβR I, TβR II的表达, RT-PCR检测胞内信号蛋白Smad3, Smad7以及Colla2 mRNA的表达。

结果: 与正常对照组相比, 模型组TGFβ₁、TβR I、TβR II、Smad3、Colla2表达明显增强, Smad7表达明显下降。经肝炎平治疗后大鼠肝脏TGFβ₁及其受体TβR I, TβR II表达均比模型组减弱(TGFβ₁: 4.30±0.16 vs 4.18±0.17, $P<0.05$; TβR I: 4.35±0.14 vs 4.24±0.10, $P<0.05$; TβR II: 4.37±0.11 vs 4.27±0.08, $P<0.05$)。肝炎平同时下调Smad3和Colla2 mRNA的表达(Smad3: 0.93±0.05 vs 0.90±0.41, $P<0.05$; Colla2: 0.95±0.03 vs 0.92±0.03, $P<0.05$)。上调Smad7 mRNA的表达(0.84±0.05 vs 0.87±0.03, $P<0.05$)。另外, 肝炎平组大鼠肝脏病理变化显著改善。

结论: 肝炎平对大鼠肝纤维化肝脏TGFβ₁/Smad信号通路有明显的抑制作用, 能抑制CCl₄诱导的大鼠肝纤维化, 其作用机制可能为抑制TGFβ₁及其受体TβR I, TβR II蛋白表达, 下调Smad3 mRNA, 上调Smad7 mRNA的表达, 并最终下调了作为主要细胞外基质的Colla2 mRNA的表达。

关键词: 肝炎平; TGFβ₁/Smad信号通路; 肝纤维化

熊章鄂, 但自力, 唐望先, 严红梅. 中药肝炎平对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠TGFβ₁/Smad信号通路的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(2):152-157

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/152.asp>

0 引言

中药肝炎平由黄芪、丹参、虎杖等多味中药组

方而成, 具有清热解毒、化湿化瘀、活血通络之功效, 经多年临床应用, 显示出了良好的抗肝纤维化作用。转化生长因子β₁(transforming growth factor-β₁, TGF-β₁)是肝纤维化过程中重要的细胞因子^[1-4]。肝炎平的抗纤维化作用亦可能与TGF-β₁/Smad信号通路有关, 为了探讨其抗肝纤维化作用的机制, 我们采用CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型, 用免疫组化和RT-PCR方法检测TGF-β₁及其受体TβR I, TβR II蛋白水平及Smad3, Smad7, 前胶原α₂(I)(Colla2)mRNA水平的表达, 观察肝炎平对肝纤维化时肝脏TGF-β₁/Smad信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 肝炎平由华中科技大学同济医学院附属同济医院药厂提供, 批号: 20041110。所用一抗均购自武汉博士德公司, 免疫组化试剂盒及辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中山公司。RNA抽提试剂RNArose Reagent购自上海华舜生物工程有限公司。逆转录酶M-MLV, Oligo(dT)₁₅, RNase inhibitor, dNTP购自Promega公司, Taq酶购自MBI公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 用三蒸水溶解配成10 μmol/L工作浓度备用。清洁级♂ Wistar大鼠38只, 体重180-220 g, 由华中科技大学同济医学院实验医学动物中心提供。采用CCl₄制造肝纤维化模型, 以400 mL/L CCl₄色拉油溶液按3 μL/g sc, 每周2次, 共9 wk。大鼠随机分为3组: N组(正常对照组, 8只), A组(模型对照组, 15只), B组(肝炎平治疗组, 15只)。N组正常饲养, 每日以生理盐水10 μL/g灌胃。其余两组按上述方法造模, B组4 wk后开始以肝炎平10 μL/g灌胃给药, A组同时以生理盐水10 μL/g灌胃, 每日1次。9 wk后, 处死大鼠, 取部分肝脏组织(每只大鼠部位相同), 40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切片行HE染色。

1.2 方法

1.2.1 肝脏TGF-β₁、TβR I、TβR II表达的检测 石蜡切片常规脱蜡至水, 30 mL/L H₂O₂孵育15 min, 抗原修复, 正常血清封闭, 1:50稀释的一抗4℃孵育过夜, 生物素化二抗37℃孵育15 min, SP 37℃孵育15 min, DAB染色。PBS代替一抗作空白对照。每张切片随机选取不重叠的10个视野摄取图像, 用HPIAS-1000型多媒体彩色病理图文分析系统进行图像半定量分析, 测定每张切片阳性表达区域的平均光密度值, 求平均值并取对数作为该张切片的阳性表达强度。

1.2.2 Smad3、Smad7及Colla2在mRNA水平的

■创新盘点

本文结果显示中药肝炎平能在多水平、多靶点作用于TGFβ₁及其信号通路, 为其良好的抗肝纤维化作用提供了有力的实验依据, 为进一步深入研究祖国中草药的抗肝纤维化作用提供了重要思路。

■同行评价

本研究从TGF- β_1 与Smad, 2, 3作用的线索出发, 研究了肝炎平的抗肝纤维化机制. 方法思路比较先进, 结论与结果相符. 图片资料清晰, 对读者有启发作用.

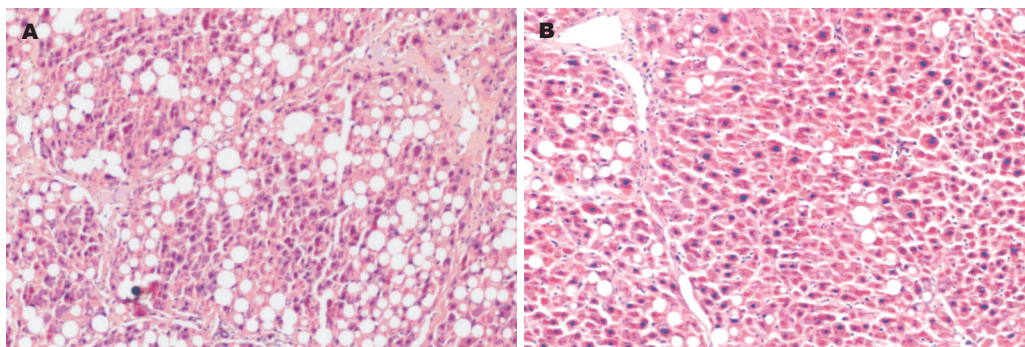


图1 A: 大鼠CCl₄所致肝损伤 (HE × 100); B: 肝炎平治疗组 (HE × 100).

表1 大鼠肝组织TGF- β_1 , T β R I, T β R II, Smad3, Smad7, Col1a2的表达 (mean \pm SD)

分组	TGF- β_1	T β R I	T β R II	Smad3	Smad7	Col1a2
正常对照	4.06 \pm 0.14	4.03 \pm 0.11	4.01 \pm 0.12	0.85 \pm 0.02	0.92 \pm 0.04	0.86 \pm 0.05
模型对照	4.30 \pm 0.16 ^b	4.35 \pm 0.14 ^b	4.37 \pm 0.11 ^b	0.93 \pm 0.05 ^b	0.84 \pm 0.05 ^b	0.95 \pm 0.03 ^b
肝炎平治疗	4.18 \pm 0.17 ^a	4.24 \pm 0.10 ^a	4.27 \pm 0.08 ^a	0.90 \pm 0.41 ^a	0.87 \pm 0.03 ^a	0.92 \pm 0.03 ^a

^a $P < 0.05$ vs 模型对照; ^b $P < 0.01$ vs 正常对照.

表达 按照RNA抽提试剂RNArose Reagent使用说明进行. 紫外分光光度计测RNA浓度及纯度. 取总RNA 2 μ g在50 μ L体系下逆转录反应合成cDNA, 取cDNA 4 μ L作为模板进行PCR反应. Smad3上游引物5'-CAGGGCTTTGAGGCTGTCTA-3', 下游引物5'-CTGGCATCTTCTGTGGTTTC-3', 扩增片段长度357 bp, 退火温度54 $^{\circ}$ C; Smad7上游引物5'-ACTGGTGC GTGGTGGCATACTGG-3', 下游引物5'-GCCGATCTTGCTCCTCACTTTCTG-3', 扩增片段长度176 bp, 退火温度60 $^{\circ}$ C; Col1a2上游引物5'-CAGCGGAGGAGGCTATGACTTT-3', 下游引物5'-GGCGAGATGGCTTATTCGTTTT-3', 扩增片段长度707 bp, 退火温度58 $^{\circ}$ C; 亲环素CYC作为内参, 上游引物5'-CTTCGACATCACGGCTGATGG-3', 下游引物5'-CAGGACCTGTATGCTTCAGG-3', 扩增片段长度265 bp, 退火温度56 $^{\circ}$ C. 取PCR反应产物6 μ L在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳45 min, 电压80 V, 电泳缓冲液为0.5 \times TBE. 图像分析仪采图, BandsCan 5.0软件分析图像灰度值, 并以单位面积的扩增片段/单位面积的CYC的灰度值(取对数)表示所扩增目的基因片段的相对表达水平, 作半定量分析.

统计学处理 采用SPSS 11.5统计软件包, 组间比较用 t 检验, 结果以mean \pm SD表示.

2 结果

2.1 病理组织学改变

正常组肝细胞以中央静脉

为中心向四周呈放射状排列, 结构正常. 模型组肝组织病理损害严重, 正常结构被破坏, 肝索排列紊乱, 肝细胞明显肿胀变性, 其中多为脂肪变性, 肝小叶中央区明显坏死. 间质内有炎性细胞浸润, 胶原增生显著, 增生结缔组织分割肝小叶, 接近形成假小叶. 肝炎平治疗组与模型组相比, 肝组织结构破坏不明显, 肝细胞脂肪变性程度显著减轻, 可见少量炎性细胞浸润, 肝细胞坏死减轻, 少见纤维结缔组织增生(图1A, B).

2.2 免疫组化结果 TGF- β_1 在正常组肝组织肝窦处有阳性着色, 与正常组比较模型组TGF- β_1 表达明显增强($P < 0.01$), 主要分布于纤维组织增多的区域以及汇管区、肝血窦、坏死灶等处, 以纤维隔中炎性细胞胞质及其周围多见, 提示肝脏间质细胞是TGF- β_1 的主要来源细胞(图2A). 肝炎平治疗组阳性染色程度较模型组明显减轻($P < 0.05$), 纤维隔中炎性细胞胞质阳性染色明显减少(图3A). 正常对照组肝细胞和间质细胞可见T β R I和T β R II阳性染色, 模型组T β R I和T β R II阳性染色显著增强($P < 0.01$), 尤以纤维增生组织和炎性细胞周围多见(图2B, C). 肝炎平治疗组阳性染色程度较模型组明显减轻(图3B, C)($P < 0.05$, 表1).

2.3 RT-PCR结果 与正常组相比, 模型组Smad3, Col1a2 mRNA表达增强($P < 0.01$), 肝炎平治疗组较模型组表达减弱($P < 0.05$), 肝炎平治疗组与模型组相比有显著差异; 模型组Smad7较正常组表达降低($P < 0.01$), 而与模型组比较, 肝炎平治疗

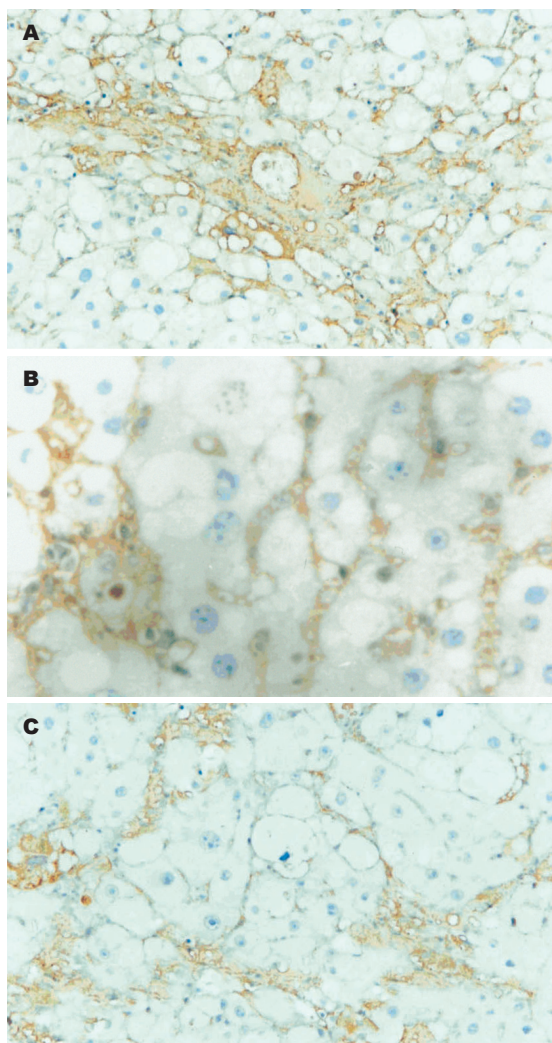


图 2 大鼠CCl₄所致肝损伤免疫组化染色. A: TGF-β₁ (SP × 200); B: TβR I (SP × 400); C: TβR II (SP × 200).

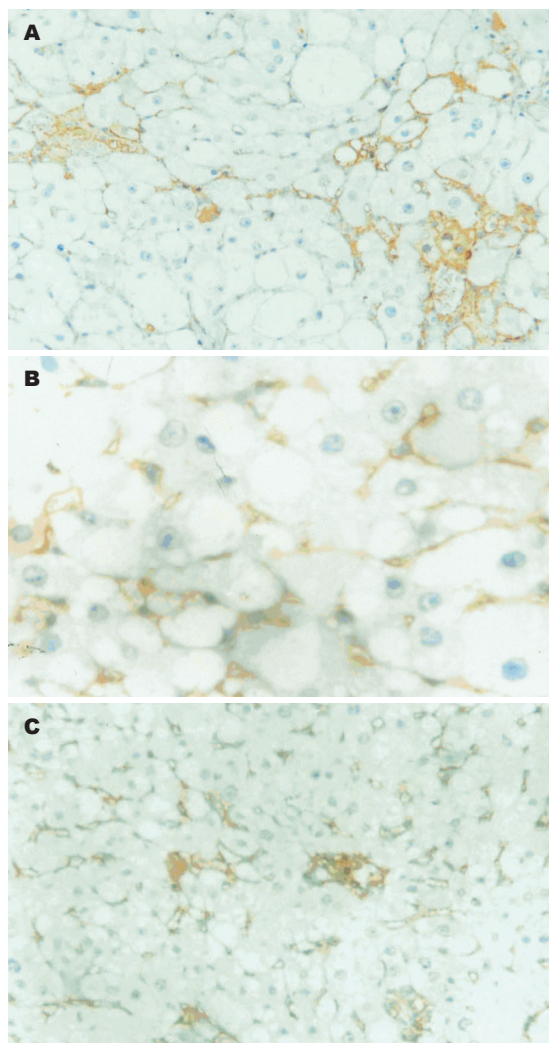


图 3 肝炎平治疗组免疫组化染色. A: TGF-β₁ (SP × 200); B: TβR I (SP × 400); C: TβR II (SP × 200).

组表达增强($P < 0.05$), 肝炎平治疗组与模型组相比有显著差异(表1, 图4).

3 讨论

转化生长因子β₁(transforming growth factor-beta1, TGF-β₁)是最重要的促纤维化生长因子, 活化后的TGF-β₁结合于特异性受体后进入信号转导途径, 发挥其生物学作用^[5,6]. TGF-β受体存在于体内所有细胞并仅能结合激活的TGF-β. TGF-β受体属丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)蛋白激酶受体^[7], 分为3型: I型(TβR I), II型(TβR II), III型(TβR III). TβR I和TβR II参与信号转导. TβR II是一种结构性激酶, 有自身磷酸化的功能. TGF-β₁在TβR III递呈作用下结合于TβR II, 然后TβR I被迅速募集到TGF-β-TβR II二聚体中, 并被TβR II磷酸化, 磷酸化后的TβR I具有激酶活性并传递信号给下游底物. TβR II在胞质区域有丝氨酸/苏氨酸激酶活性, 在功能

上对信号传递起闸门作用^[6]. 被TβR II激活的TβR I能够激活胞质中转导信号至核内的信号蛋白Smads^[8]. 迄今为止, Smad蛋白是TGF-β受体胞内激酶的唯一底物^[8], 他既是胞内信号分子, 又有转录激活作用. 目前所知的8种Smad蛋白中, 只有Smad2、Smad3是TβR I的底物, 介导TGF-β₁信号^[9]. TGF-β₁介导的受体调节型Smad2和Smad3的磷酸化导致的构象变化使之易于与Smad4相互作用, 并转移至核内. 在核内, 一旦Smad2/3-Smad4复合物结合到靶基因的启动子, 可根据细胞类型的不同, 激活或抑制转录^[10]. 经Smad通路的TGF-β信号转导途径的研究表明^[11], Col1a2, Col3a1, Col6a1, Col6a3, TIMP- I以及PAI-1均是受其调控的靶基因. Smad3与Smad4形成复合物并转移至核内, 并在核内转录调节TGF-β靶基因的启动子, 如纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)和I型胶原α链, 他们在多种组织的纤维化进程中

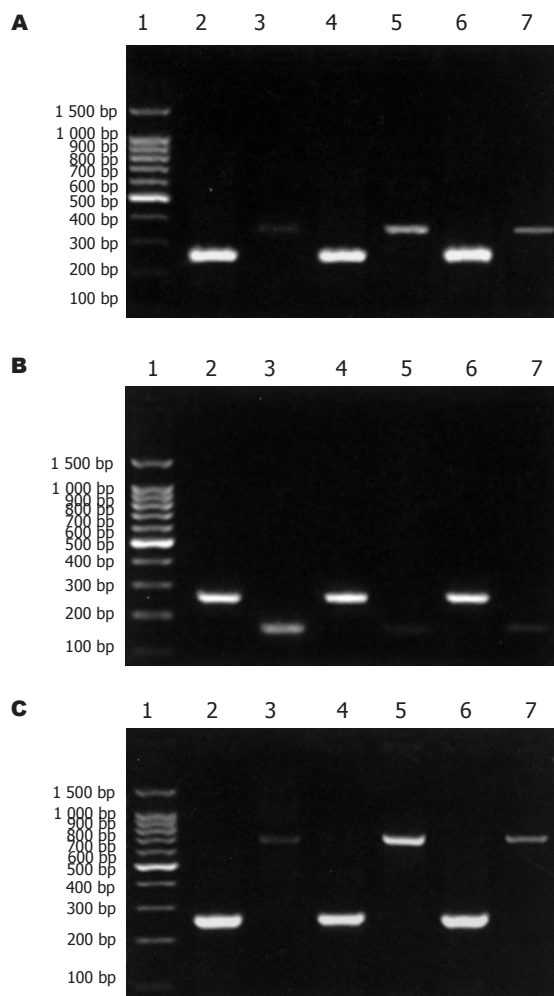


图4 肝炎平对Smad3、Smad7以及Col1a2 mRNA表达的影响。1: DNA Ladder Marker; 2, 4, 6: 正常组、模型组、肝炎平治疗组内参; 3, 5, 7: 正常组、模型组、肝炎平治疗组目的基因。A: Smad3; B: Smad7; C: Col1a2。

均有重要作用。I型胶原是纤维化进程中主要的胞外基质,已有研究表明^[5], Smad3是HSC活化的重要媒介,减少Smad3的激活被认为是调节下游I型胶原表达的关键步骤。Smad7是一种抑制型Smad,他与T β R I结合后阻止其招募Smad3及磷酸化,从而抑制TGF- β_1 信号的传导。Smad7也能使E3泛素连接酶Smurfs 1和2(Smad ubiquitination regulatory factors 1 and 2)结合于T β R I,随后使之泛素化而降解。在慢性肝损伤过程中Smad7的水平降低^[12],失去了对TGF- β 信号潜在的抑制作用,而诱导Smad7的表达^[13],能够竞争性抑制Smad2/3的核转位,阻断TGF- β_1 信号的传导,减少I和III型胶原的表达。

本结果显示,肝炎平治疗组肝纤维化程度较模型组明显减轻,肝炎平能够显著抑制TGF- β_1 及其受体T β R I, T β R II的表达($P<0.05$),拮抗胞内关键信号分子Smad3,上调Smad7在mRNA水

平的表达($P<0.05$),并最终抑制了Col1a2 mRNA的表达($P<0.05$)。目前认为^[14],阻断TGF- β_1 的合成和信号是抗纤维化治疗的主要目标,随着细胞生物学的发展,开展了在多种水平上抑制TGF- β_1 的尝试。这些主要包括抗氧化剂的应用^[15-19],中和性抗体^[20]以及中草药^[21-23],起负性作用可溶性受体的表达^[24,25],拮抗性细胞因子的应用^[26-28]以及运用反义寡核苷酸阻断TGF- β_1 的合成等^[29]。祖国医学认为,肝纤维化的形成主要是由于湿热、气虚、血瘀所致。肝炎平主要由黄芪、丹参、虎杖等多味中药组成,具有活血化瘀、清热解毒、疏肝利胆、益气化湿的功效,正是针对肝纤维化的病理环节组方。我们以前的研究发现^[30,31],肝炎平能有效调节免疫机制,降低TNF- α , IL-6, IL-8等细胞因子的生成和释放,减少肝损害时肝组织氧自由基的产生,提高细胞SOD活性,对急慢性肝损伤有很好的保护作用,并具有防治肝纤维化的作用,但一直对其作用的分子机制不甚明确。本研究表明,肝炎平可在多层次、多靶点通过TGF- β_1 /Smad信号通路发挥作用从而抑制肝纤维化的发生与发展,这可能是其抗肝纤维化作用的重要机制。

4 参考文献

- 1 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- 2 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-d826
- 3 Flisiak R, Wiercinska-Drapalo A, Tynecka E. Transforming growth factor beta in pathogenesis of liver diseases. *Wiad Lek* 2000; 53: 530-537
- 4 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34: 859-867
- 5 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during trans-differentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 6 Hernandez-Canaveral I, Gonzalez J, Lopez-Casillas F, Armendariz-Borunda J. Amplified expression of dominant-negative transforming growth factor-beta type II receptor inhibits collagen type I production via reduced Smad-3 activity. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 380-387
- 7 ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265-273
- 8 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19: 1745-1754
- 9 Attisano L, Wrana JL. Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 188-194
- 10 Ellis LR, Warner DR, Greene RM, Pisano MM.

- Interaction of Smads with collagen types I, III, and V. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 1117-1123
- 11 Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-β₁/Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 2001; 276: 17058-17062
- 12 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-β₁ signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35: 49-61
- 13 Terada Y, Hanada S, Nakao A, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Gene transfer of Smad7 using electroporation of adenovirus prevents renal fibrosis in post-obstructed kidney. *Kidney Int* 2002; 61: 94-98
- 14 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-β₁ in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 15 De Bleser PJ, Xu G, Rombouts K, Rogiers V, Geerts A. Glutathione levels discriminate between oxidative stress and transforming growth factor-β₁ signaling in activated rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 33881-33887
- 16 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. DLPC decreases TGF-β₁-induced collagen mRNA by inhibiting p38 MAPK in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1051-G1061
- 17 Meurer SK, Lahme B, Tihaa L, Weiskirchen R, Gressner AM. N-acetyl-L-cysteine suppresses TGF-β₁ signaling at distinct molecular steps: the biochemical and biological efficacy of a multifunctional, antifibrotic drug. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1026-1034
- 18 Lee CH, Jang YS, Her SJ, Moon YM, Baek SJ, Eling T. NORDIHYDROGUAIARETIC ACID, an antioxidant, inhibits transforming growth factor-β₁ activity through the inhibition of Smad signaling pathway. *Exp Cell Res* 2003; 289: 335-341
- 19 Miyazaki T, Karube M, Matsuzaki Y, Ikegami T, Doy M, Tanaka N, Bouscarel B. Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2005; 43: 117-125
- 20 Schuftan GG, Bachem MG. Alpha2-macroglobulin reduces paracrine- and autocrine-stimulated matrix synthesis of cultured rat hepatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 519-528
- 21 Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yasuda M, Shiba M, Horie T, Amagaya S, Kawada N, Hori H, Ito S. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 1999; 29: 149-160
- 22 Ochi T, Kawakita T, Nomoto K. Effects of Hochu-ekki-to and Ninjin-yoei-to, traditional Japanese medicines, on porcine serum-induced liver fibrosis in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2004; 26: 285-298
- 23 Song SL, Gong ZJ, Zhang QR, Huang TX. Effects of Chinese traditional compound, JinSanE, on expression of TGF-β₁ and TGF-β₁ type II receptor mRNA, Smad3 and Smad7 on experimental hepatic fibrosis *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2269-2276
- 24 Kanzler S, Meyer E, Lohse AW, Schirmacher P, Henninger J, Galle PR, Blessing M. Hepatocellular expression of a dominant-negative mutant TGF-β₁ type II receptor accelerates chemically induced hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2001; 20: 5015-5024
- 25 Cui X, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Inoue H, Shono M, Tamaki K, Fukuno H, Ueno H, Ito S. Inhibitory effect of a soluble transforming growth factor beta type II receptor on the activation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *J Hepatol* 2003; 39: 731-737
- 26 Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; 5: 226-230
- 27 Liu XJ, Ruan CM, Gong XF, Li XZ, Wang HL, Wang MW, Yin JQ. Antagonism of transforming growth factor-Beta signaling inhibits fibrosis-related genes. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 1609-1615
- 28 Inagaki Y, Kushida M, Higashi K, Itoh J, Higashiyama R, Hong YY, Kawada N, Namikawa K, Kiyama H, Bou-Gharios G, Watanabe T, Okazaki I, Ikeda K. Cell type-specific intervention of transforming growth factor beta/Smad signaling suppresses collagen gene expression and hepatic fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2005; 129: 259-268
- 29 Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 33-42
- 30 Tang WX, Dan ZL, Yan HM, Wu CH, Zhang G, Liu M, Li Q, Li SB. Experimental study of effect of Ganyanping on fibrosis in rat livers. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1292-1295
- 31 唐望先, 严红梅, 张国, 但自立, 刘梅, 吴翠环, 李绍白. 肝炎平抗大鼠肝纤维化酶组织化学的实验研究. 同济医科大学学报 2004; 33: 276-278

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

大肠杆菌表面 CS3 菌毛展示随机肽库的构建

刘向昕, 袁盛凌, 展德文, 郑继平, 刘纯杰, 王 芃, 王令春, 张兆山

■背景资料

运用重组DNA技术在微生物表面呈现外源蛋白或多肽, 在微生物学、分子生物学、疫苗学和生物技术等方面得到了广泛的应用。对噬菌体、细菌、真菌、病毒等都在进行这方面的研究。噬菌体表面展示技术比较成熟, 但其本身存在一些限制。细菌表面展示系统是继噬菌体表面展示系统之后发展起来的, 其呈现载体多样, 可根据不同的需要呈现不同的蛋白, 达到不同的目的。近年来其应用领域已扩展到包括重组细菌疫苗、多肽库筛选系统、全细胞吸附剂、重组全细胞催化剂以及作为诊断的细胞基础的固相试剂等。

刘向昕, 袁盛凌, 展德文, 郑继平, 刘纯杰, 王 芃, 王令春, 张兆山, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071

刘向昕, 女, 1974-07-07生, 山西省太原市人, 汉族, 2004年中国人民解放军军事医学科学院博士生, 主要从事基因工程疫苗研究。

国家高技术研究发展863计划项目, No.2004AA215212

通讯作者: 张兆山, 100071, 北京丰台区东大街20号, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所. zhangzs@nic.bmi.ac.cn
电话: 010-63834140 传真: 010-63833521

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-12-08

Construction of a CS3 fimbria-displayed random peptide library on *Escherichia coli* cell surface

Xiang-Xin Liu, Sheng-Ling Yuan, De-Wen Zhan, Ji-Ping Zheng, Chun-Jie Liu, Peng Wang, Ling-Chun Wang, Zhao-Shan Zhang

Xiang-Xin Liu, Sheng-Ling Yuan, De-Wen Zhan, Ji-Ping Zheng, Chun-Jie Liu, Peng Wang, Ling-Chun Wang, Zhao-Shan Zhang, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No.2004AA215212

Correspondence to: Zhao-Shan Zhang, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, 20 Dongdajie Street, Fengtai District, Beijing 100071, China. zhangzs@nic.bmi.ac.cn

Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-12-08

Abstract

AIM: To construct a CS3 fimbria-displayed random peptide library on the *Escherichia coli* cell surface.

METHODS: Firstly, a new display vector with double restriction sites was reconstructed, and the ability of the new vector to form CS3 fimbriae on *E. coli* surface was confirmed by Western blot and transmission electron microscopy. Then two oligonucleotides were synthesized, one of which contained a random oligonucleotide encoding region (NNK)₁₀ and the other was its complement. The two synthesized oligonucleotides was annealed and then extended by Klenow Fragment. The double-stranded oligonucleotides were digested by *Xho* I and *Bam*HI

I and purified by PAGE, then inserted into the digested display vector. The ligation product was purified and electroporated into XL1-Blue. Ten randomly selected clones were sequenced and the sequences were analyzed.

RESULTS: A library with diversity of 1.8×10^6 was obtained. The sequencing results confirmed the basic frame of the constructed library to be correct and the bases of A, T, G, and C were distributed randomly.

CONCLUSION: A random ten-peptide library is displayed on the *Escherichia coli* cell surface using CS3 fimbriae display system.

Key Words: CS3 fimbria; Bacterial surface display; Random peptide library

Liu XX, Yuan SL, Zhan DW, Zheng JP, Liu CJ, Wang P, Wang LC, Zhang ZS. Construction of a CS3 fimbria-displayed random peptide library on *Escherichia coli* cell surface. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):158-162

摘要

目的: 在肠毒素性大肠杆菌CS3菌毛表面构建10肽随机肽库。

方法: 首先将原有的单酶切CS3菌毛呈现载体改造为双酶切载体, 并证实改造后的载体能正确形成CS3菌毛。同时设计合成2条寡核苷酸序列, 链1含有1个10肽随机编码序列(NNK)₁₀, 链2可与链1的3'端互补。两条链经过退火、延伸、酶切和回收与经过同样酶切的呈现载体连接, 连接产物纯化后分多次电击转化, 获得随机肽库。随机挑选10个克隆进行测序并对测序结果进行分析。

结果: 获得1个库容量为 1.8×10^6 大小的随机肽库。测序结果显示, 所构建肽库的基本框架与预期设计相符, 4个寡核苷酸出现的频率也与理论值相接近。

结论: 在肠毒素性大肠杆菌CS3菌毛表面成功构建库容量为 1.8×10^6 大小的10肽随机肽库。为下一步利用肽库进行筛选奠定了基础。

关键词: CS3菌毛; 细菌表面展示; 随机肽库

刘向昕, 袁盛凌, 展德文, 郑继平, 刘纯杰, 王凡, 王令春, 张兆山. 大肠杆菌表面CS3菌毛展示随机肽库的构建. 世界华人消化杂志 2006;14(2):158-162

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/158.asp>

0 引言

众所周知, 疫苗是通过表面的多个优势抗原表位, 刺激机体产生免疫应答, 抵制外来病原体发挥作用的. 因而, 抗原表位的获得在疫苗研制中具有极为重要的作用. 微生物表面展示随机肽库技术的发展与成熟, 为抗原表位的确定提供了一个高通量筛选工具, 成为目前确定抗原表位的主要方法之一. 所谓微生物表面展示随机肽库, 就是将随机编码的多肽序列与相应的载体(噬菌体、细菌、病毒和酵母等)蛋白融合并活性表达于其表面, 构成随机肽库. 利用生物淘洗等筛选方法, 即可快速有效地获得抗原表位. 在微生物表面展示随机肽库中, 噬菌体肽库比较成熟, 细菌展示肽库是继其后发展起来的, 其优势在于除了可用传统的生物淘洗法筛选外, 还可利用荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)技术进行更快速更高效的筛选^[1]. 另外, 在利用筛选出的抗原表位构建重组活菌苗的过程中, 细菌表面展示系统与噬菌体相比也有独特的优势, 包括可供选择的载体蛋白种类较多, 免疫佐剂作用明显以及易于构建多价疫苗等^[2].

研究表明, 细菌的外膜蛋白、脂蛋白、菌毛蛋白(如K88, CS31A, P纤毛)以及鞭毛蛋白都能够作为外源蛋白的表面呈现载体. Lu *et al*^[3]在1995年利用鞭毛为骨架构建FliTrxTM随机12肽库, 应用到抗原表位筛选^[3]、蛋白磷酸化酶1结合位点确定^[4]、细胞特异性结合肽^[5]以及肿瘤成血管肽筛选研究^[6]; Kjaergaard *et al*^[7]利用菌毛FimH为骨架构建随机肽库, 并从中成功筛选得到Zn²⁺结合肽. 菌毛在细菌表面数量很多, 每根菌毛又含有500-1 000拷贝的菌毛蛋白, 而且具有较强的免疫原性, 特别适合于构建基因工程活菌疫苗. 肠毒素性大肠杆菌(*enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)是引起婴幼儿和旅游者腹泻的主要病原菌, 他的致病性依赖于两类毒性因子, 即肠毒素和定居因子抗原(colonization factor antigens, CFAs). CS3是CFA/II阳性菌株的共有抗原, 由60 Mu的大质粒编码^[8]. 本实验室构

建了CS3菌毛呈现载体, 并证明在包括信号肽在内的CS3的第72-73位氨基酸间插入从9肽到19肽的多种抗原表位后, 外源表位都能得到呈现^[9]. 现利用此呈现载体并加以改造, 在大肠杆菌CS3菌毛上构建了细菌表面展示随机肽库, 为今后筛选抗原表位以及进一步构建重组活菌苗的研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌DH5 α 和XL1-Blue为本实验室保存. CS3呈现载体pCSX72由本实验室构建. CS3单克隆抗体由瑞典Gobebourgs大学A.M.Svennerholm教授惠赠. 限制性内切酶、DNA聚合酶I (Klenow大片段)以及T4 DNA连接酶等均为New England Biolabs产品. 质粒纯化试剂盒购自Promega公司, 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒和聚丙烯酰胺凝胶DNA回收试剂盒购自北京天为时代公司, HRP标记羊抗鼠IgG, DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物公司. DNA分子质量标准pBR322/Msp I 和DL15000分别为华美生物工程公司和大连宝生物公司产品, 低分子量蛋白标准购自安玛西亚公司. 引物合成及测序分别由上海博亚生物技术公司和上海华诺生物科技公司完成. JOELJME 1200EX II扫描电镜由军事医学科学院微生物流行病研究所提供.

1.2 方法 构建双酶切载体pCSXB72合成2条寡核苷酸序列: 5' CTAGACTCGAGACTAG-TACGCGTGGATCCT 3' (含有Xho I 和BamH I 酶切位点)和5' TGAGCTCTGATCATGCG-CACCTAGGAGATC 3' (含有Xho I 和BamH I 酶切位点). 将2条引物退火, 两端即形成Xba I 酶切位点, 与同样用Xba I 酶切并去磷酸化的载体pCSX72连接, 构建为包含Xho I 和BamH I 酶切位点的双酶切载体pCSXB72.

1.2.1 电镜下观察菌毛形成^[10] 收获在CFA平板上培养18-20 h的转化有pCSXB72的大肠杆菌XL1-Blue, PBS洗涤3遍后, 用适量的PBS重悬, 使 $A_{600} = 1.0$; 吸取一滴细菌悬液滴加在喷有炭膜的铜网上, 放置1 min; 将菌液弃掉, 用PBS洗一遍, 稍干后用20 g/L磷钨酸负染20 s, 干燥后在扫描电镜下观察.

1.2.2 菌毛蛋白的粗提及Western印迹分析 收获在CFA平板上培养的重组菌, 用PBS洗2遍, 重悬于适量的PBS中, 60℃水浴放置30 min, 涡振荡器剧烈振荡1 min, 12 000 g离心10 min,

■研究前沿

噬菌体展示技术在肽库构建与筛选研究中获得极大成功, 细胞表面展示技术作为一种配体筛选方法, 是对噬菌体展示文库的有力补充. 一些细胞表面展示的多肽文库已构建成功并用于筛选高亲和力的多肽配体. 如基于*E.coli*鞭毛蛋白FliC所构建的FLITRX系统, 就被成功用于多肽文库的展示. 另外, 抗体片段也可以展示于细菌或酵母表面, 从而使抗体库的构建成为可能. 细胞表面展示文库的最大优点在于他可借助荧光激活细胞分选技术进行高通量筛选, 从而大大加快和简化筛选过程.

■创新盘点

本研究中采用的CS3菌毛呈现载体是由我们自行构建的载体,并进一步用于构建随机肽库,因而具有良好的工作基础和自主知识产权;在肽库构建过程中,通过将其改造为双酶切载体和优化各种酶切,连接和转化条件,提高了库容量,可基本满足下一步筛选的要求。

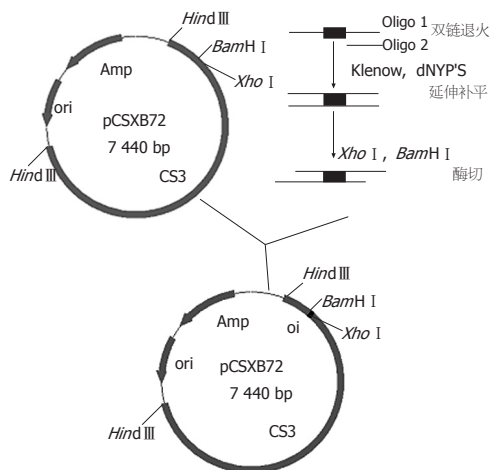


图1 CS3菌毛展示随机肽库构建示意图。

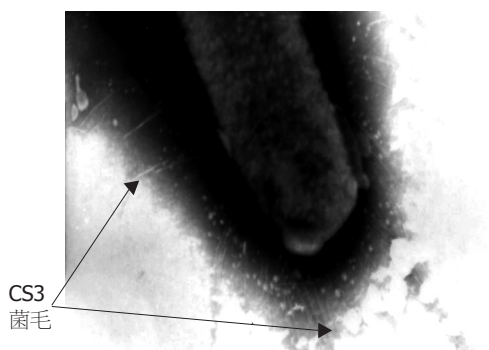


图2 XL1-Blue (pCSXB72)表面表达CS3菌毛 (SEM × 30 000)。

上清即含有菌毛蛋白^[11]。菌毛蛋白经过SDS-PAGE(150 g/L分离胶和50 g/L积层胶)分离,用湿式转移电泳的方法将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,加封闭液(含50 g/L脱脂奶粉的PBST)室温缓慢摇动封闭1 h,加CS3单克隆抗体结合2 h, PBST洗膜3次后,加HRP标记羊抗鼠IgG室温孵育1 h, PBST洗膜3次后,用DAB显色试剂盒显色。

1.2.3 随机肽库的构建 随机肽库构建^[12]的基本流程如图1, 具体操作: (1)线性化载体的制备. 提取质粒pCSXB72, 用Xho I 和BamH I 进行双酶切, 琼脂糖凝胶回收目的片段, 共需线性化载体约为12 μg, 冻存备用. (2)随机寡核苷酸插入片段的制备. 根据载体pCSXB72两端的Xho I 和BamH I 酶切位点情况以及构建随机肽库的要求, 设计合成两条随机寡核苷酸片段, 链1序列为5' GGACGCCTCGAG(NNS)₁₀GGATCCGC GACCA GT 3', 其中NNS为随机序列(N为A、G、C、T四种碱基之一, S为G、C两种碱基之一), 两端为保护碱基和酶切位点; 链2序列为5' ACTGGTCGCGGATCC 3', 与链1的3' 端互补. 在Eppendorf管中加入退火缓冲液[TE(pH

8.0)+100 mmol/L NaCl]12 μL, 100 μmol/L的链1, 链2各4 μL, 95℃加热10 min, 缓慢降至室温, 继续加入2.5 mmol/L的dNTP 10 μL, Klenow 大片段10 μL, 10×Klenow缓冲液16 μL, 37℃ 40 min, 75℃ 15 min. Xho I 和BamH I 进行双酶切, PAGE(160 g/L)分离, 聚丙烯酰胺凝胶DNA回收试剂盒回收目的条带, 共需插入片段约300 ng. (3)连接及连接产物的纯化. 对酶切回收的载体与插入片段进行定量, 在300 μL反应体系以适当的连接比连接数管, 连接产物用酚: 氯仿(1:1)抽提2次, 氯仿抽提1次后, 进行乙醇沉淀, 最后分别溶于35 μL TE(pH 8.0)中. (4)电转化构建随机肽库. 电转化感受态细胞XL1-Blue的制备参照文献[13]. 取3 μL回收纯化的连接产物加入100 μL电转化感受态细胞中, 利用Bio-Rad公司的电转化仪进行电转化. 电击参数为: 电极间隙0.2 cm, 电压2.5 kV, 电容25 μF, 电阻200 Ω, 电击后尽快加入500 μL SOC培养基混匀, 将混合物转移至Eppendorf管中, 冰上放置, 如此共电击30次. 待全部样品转化完毕, 37℃振荡培养45 min, 取适当样品稀释后涂SOB平板. 其他加入到LB培养基30 mL中, 37℃振荡培养6 h, 取样进行平板计数. 其余加甘油至终浓度为250 mL/L, 分装成小管, -70℃冻存备用. (5)序列测定. 根据载体pCSXB72序列, 在插入位点上游设计测序引物, 5' CACTGTCAGCTATGAGTTCA 3'. 取构建的肽库中适量样品稀释后涂平板, 随机挑选10个克隆, 进行序列测定, 对肽库进行基本框架验证及多样性评价。

2 结果

2.1 双酶切载体的构建及菌毛形成能力的鉴定 由于单酶切载体自连率太高, 我们在原有载体的基础上构建了双酶切载体pCSXB72, 测序证明载体构建正确. 将pCSXB72转化XL1-Blue后在电镜下可观察到菌毛生长(图2), 进一步提取菌毛蛋白进行Western印迹实验, 证明新构建的载体能形成CS3菌毛(图3)。

2.2 随机肽库的构建 在构建肽库的过程中, 首先将载体进行双酶切(图4), 与经过同样酶切的随机寡核苷酸片段(图5)进行连接. 由于载体与插入片段的摩尔比是连接效率的关键因素, 我们分别将载体与插入片段以1:0, 1:3, 1:5, 1:10的摩尔比进行连接. 实验表明, 当载体与插入片段的摩尔比是1:5时, 连接效率最高, 此时与

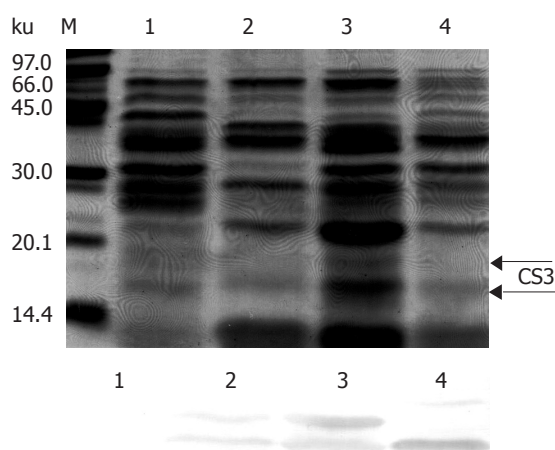


图3 CS3菌毛的SDS-PAGE和Western印迹. M: 低分子质量蛋白标准; 1: XL1-Blue/pCSX72; 2: XL1-Blue/pCSXB72; 3: 随机肽库中任意挑选的克隆.

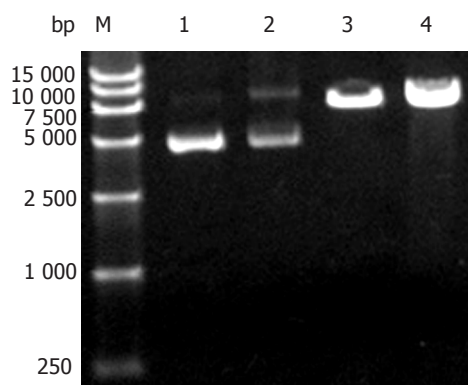


图4 载体酶切与回收产物电泳结果. M: DL15000分子质量标准; 1: 载体pCSX72; 2: 载体pCSXB72; 3: *Xho* I和*Bam*H I酶切后的载体pCSXB72; 4: 双酶切后回收的载体pCSXB72.

摩尔比为1:0的转化菌落数相比大于100倍, 因此采用1:5的摩尔比进行连接. 连接产物电转化后, 取样进行平板计数, 表明含有 1.8×10^6 个原始克隆, 即该随机肽库的库容量为 1.8×10^6 . 原始肽库扩增后再次进行平板计数为 6.5×10^8 , 这样每一克隆的拷贝数约为360, 所构建肽库的库容量可基本满足筛选的要求.

2.3 随机肽库的鉴定 从构建好的随机肽库中, 任意挑选10个克隆进行测序(图6), 根据测序结果统计四种碱基出现频率(表1). 结果显示, 四种碱基出现情况与预先设计的NNS相符, 即第1, 2位碱基分别为A, C, G, T中的任一种, 第3位碱基为G/C中的任1种. 四种碱基出现频率与理论值相近. 而实测值与理论值的差异可能是由于所测序列较少, 当所测序列样本增大时, 这种差别就会减少到最低. 在氨基酸组成方面, 以上10个序列中包含了19种氨基酸, 只有苯丙氨酸未包括.

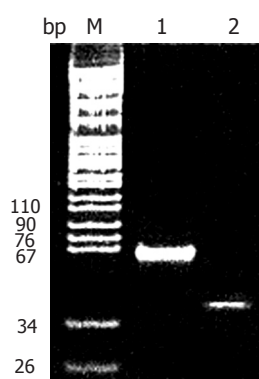


图5 随机寡核苷酸双链酶切回收产物的PAGE电泳结果. M: pBR322 DNA/*Msp* I 分子质量标准; 1: 随机双链退火、延伸补平产物 (57 bp); 2: 延伸产物酶切后回收片段 (36 bp).

序列1 CAG GGC AAC GGG GAC GTC AGC GTC AAG AGG
序列2 CAC GGG GAC TGC ATG TTG GGC CTG ATG GTG
序列3 CGC TAG GCG GCG CGG GCC GGC GGC AGC ACC
序列4 GGC GGC CAG TAG GCC TGC CAG GCG TGC GAG
序列5 TCC TGC AGG ACC GTG GGC GCG CGG TGG TGG
序列6 CTG GTC GGG GCC GTG TTG AGC TAC CAG TTG
序列7 CTC ATC GAG AGG ACG TGC TGC AAG GGG GTG
序列8 AGG ATG CTG AGC GGG GTG ATG ATC CCG GCC
序列9 TTG GAC TAG TCG TAC AAC GAG CTG CAC TTG
序列10 TCC TAG CGG TGC GAG CGC GGG CGC CAG GTG

图6 任意挑选克隆序列测定结果.

表1 10个克隆中4种碱基出现频率统计 (%)

	A	G	C	T
N	22.5	36.5	17.0	24.0
S	0	56.0	44.0	0

这些结果表明, 我们所构建肽库的基本框架以及寡核苷酸出现的频率均达到了肽库构建的要求. 同时, 从随机肽库中任意挑选一个克隆, 进行Western印迹分析, 证明在插入10肽随机序列后, 仍能正确形成CS3菌毛(图3).

3 讨论

尽管随机肽库的构建方法目前已比较成熟, 但是不同的随机肽库、不同的展示载体, 具体方法往往不一样, 肽库构建的每一个过程都有可能影响其质量. 因此, 在肽库构建的过程中, 要通过提高每一步反应的效率, 构建具有更大库容量和多样性的肽库, 为筛选奠定良好的基础. 随机寡核苷酸片段的设计采用常用的NNS模式, 组成32种密码子, 既可以编码20种氨基酸和一种终止密码子(TAG), 又减少了随机寡核苷酸序列中出现终止密码子的频率. 由于前期研究中

■应用要点

利用多肽库和体外筛选技术来识别和分离具有特定性质的多肽, 是生物学中一个快速发展的领域. 其应用领域包括: 抗原表位的筛选; 分离金属结合肽; 抗体亲和力成熟; 提高酶催化活性; 改变底物特异性; 筛选结合肽等. 由于菌毛在细胞表面以极高的拷贝存在, 他们具有强免疫原性和黏附特性, 而且易于纯化, 因此利用菌毛呈现的随机肽库可用于筛选抗原表位或金属结合肽, 并进一步用于构建基因工程活菌疫苗或重金属去除吸附剂.

■同行评价

该研究利用CS3菌毛呈现载体寡核苷酸分子克隆技术构建随机肽库,获得一个库容量为 1.8×10^6 大小的肽库,为筛选抗原表位以及进一步构建重组活菌苗的研究奠定基础。另外,本研究起点较高方法技术先进,结果可靠,具有一定的科学意义和实用价值。

构建的单酶切呈现载体pCSX72自连现象严重,因此首先将其改造为双酶切载体,大大减少了自连现象,提高了连接效率。接着,在对载体和随机寡核苷酸片段进行彻底的酶切、确定连接条件和转化条件等多个环节中,都进行反复实验以摸索出最佳条件。受细菌本身转化效率的影响,构建细菌表面展示随机肽库的库容量较噬菌体随机肽库要小的多,目前已报道的随机肽库容量多在 10^5 - 10^7 之间。我们通过多次转化获得的随机肽库容量为 1.8×10^6 ,可基本满足下一步筛选的要求。

在革兰阴性菌表面展示蛋白,需要重组蛋白能从胞质运输至外膜,然后穿过外膜锚定于细菌外表面。然而蛋白靶向并插入外膜的机制尚不清楚,而且外源蛋白插入外膜可能对细胞产生毒性。另外,由于外膜中脂多糖的空间位阻效应,可导致外源多肽表面展示效果不好,进而影响展示的外源蛋白与抗体和小分子配体的相互作用。如果将重组多肽展示于细菌表面附属结构,如鞭毛或菌毛,他们突出于细菌表面,这样就可避免空间位阻效应。同时,外源蛋白插入的部位多为菌毛表面突出的环状结构,这样使外源蛋白具有一定的空间构象依赖性,更有利于与目标蛋白结合^[14]。菌毛展示的肽段在氨基酸组成方面有一些限制。如展示的多肽相对来说是亲水性的,而且很少出现半胱氨酸。这可能是由于在水性环境中菌毛无法展示高度疏水的片段,而半胱氨酸间形成的二硫键会干扰蛋白向细胞表面运输^[15]。在本研究中,在测序的十个序列的100个氨基酸中疏水性氨基酸只有31个,但出现半胱氨酸的个数为7个。另外,为保证外源蛋白的插入不会影响大分子结构蛋白的自我装配,菌毛展示片段的大小也受到一定程度的限制。从已有的研究来看,不同菌毛的主要结构蛋白只能容纳中等大小的插入片段(10-30个氨基酸),但对于次要结构蛋白,如I型菌毛FimH,能容纳的肽段可大于100个氨基酸。这与丝状噬菌体类似,丝状噬菌体的主要结构蛋白pVIII对于插入片段大小有严格的限制,而次要结构蛋白pIII蛋白能容纳较大的片段。实际上,菌毛与丝状噬菌体的结构在许多方面相似,在表面展示领域,可以把菌毛看成是附着于表面的噬菌体^[15]。CS3亚单位是CS3菌毛的主要结构蛋白,本实验室的前期研究表明,在包括信号肽在内的CS3的第72-73位氨基酸间插入从九肽到十九肽的多种抗原表位后,外源表位都能得到呈现。

菌毛在抗原表位展示方面是很有吸引力的候选载体,因为菌毛在细胞表面以极高的拷贝存在,他们具有强免疫原性和黏附特性,而且易于纯化^[14]。因此,我们打算利用构建的CS3菌毛表面展示随机肽库,筛选抗体的抗原表位,并进一步用于构建基因工程活菌疫苗。

4 参考文献

- 1 沈倍奋. 分子文库. 北京: 科学出版社, 2001: 100-115
- 2 Georgiou G, Stathopoulos C, Daugherty PS, Nayak AR, Iverson BL, Curtiss R 3rd. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 29-34
- 3 Lu Z, Murray KS, Van Cleave V, LaVallie ER, Stahl ML, McCoy JM. Expression of thioredoxin random peptide libraries on the *Escherichia coli* cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions. *Biotechnology* 1995; 13: 366-372
- 4 Zhao S, Lee EY. A protein phosphatase-1-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *J Biol Chem* 1997; 272: 28368-28372
- 5 Herrmann A, Pieper M, Schrader J. Selection of cell specific peptides in a rat carotid injury model using a random peptide-presenting bacterial library. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472: 529-536
- 6 Brown CK, Modzelewski RA, Johnson CS, Wong MK. A novel approach for the identification of unique tumor vasculature binding peptides using an *E. coli* peptide display library. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 743-749
- 7 Kjaergaard K, Schembri MA, Klemm P. Novel Zn(2+)-chelating peptides selected from a fimbria-displayed random peptide library. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 5467-5473
- 8 Jalajakumari MB, Thomas CJ, Halter R, Manning PA. Genes for biosynthesis and assembly of CS3 pili of CFA/II enterotoxigenic *Escherichia coli*: novel regulation of pilus production by bypassing an amber codon. *Mol Microbiol* 1989; 3: 1685-1695
- 9 高荣凯, 张兆山, 李淑琴, 黄翠芬. 外源抗原表位在大肠杆菌CS3菌毛上的呈现. 高技术通讯 2000; 5: 16-20
- 10 Bakker D, van Zijderfeld FG, van der Veen S, Oudega B, de Graaf FK. K88 fimbriae as carriers of heterologous antigenic determinants. *Microb Pathog* 1990; 8: 343-352
- 11 Der Vartanian M, Girardeau JP, Martin C, Rousset E, Chavarot M, Laude H, Contrepois M. An *Escherichia coli* CS31A fibrillum chimera capable of inducing memory antibodies in outbred mice following booster immunization with the entero-pathogenic coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *Vaccine* 1997; 15: 111-120
- 12 Noren KA, Noren CJ. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods* 2001; 23: 169-178
- 13 Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001: 1119-1122
- 14 Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren PA, Stahl S. Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol* 2002; 96: 129-154
- 15 Klemm P, Schembri MA. Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiology* 2000; 146: 3025-3032

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PGE₂在内毒素诱导的幼鼠急性胃黏膜损伤中的变化及PAF受体拮抗剂对其影响

刘春英, 王丽杰, 孙梅, 赵恂, 胡月, 赵雅娟, 李军

刘春英, 王丽杰, 孙梅, 胡月, 赵雅娟, 李军, 中国医科大学第二临床学院儿科 辽宁省沈阳市 110004

赵恂, 中国医科大学实验技术中心二部 辽宁省沈阳市 110001

刘春英, 女, 1963-03-17, 副主任医师, 2003年中国医科大学博士在读, 目前主要从事儿科危重症胃肠功能障碍研究。

通讯作者: 孙梅, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学第二临床学院儿科。wlj682002@yahoo.com.cn

电话: 024-23307620 传真: 024-83955509

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-28

Change of prostaglandin E₂ and effect of platelet activating factor antagonist on prostaglandin E₂ in endotoxin-induced acute gastric mucosal injury in young rats

Chun-Ying Liu, Li-Jie Wang, Mei Sun, Xun Zhao, Yue Hu, Ya-Juan Zhao, Jun Li

Chun-Ying Liu, Li-Jie Wang, Mei Sun, Yue Hu, Ya-Juan Zhao, Jun Li, Department of Pediatrics, the Second Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Xun Zhao, the Second Department of Experimental Technique Center, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wlj682002@yahoo.com.cn

Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-28

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of prostaglandin E₂ (PGE₂) in endotoxin-induced acute gastric mucosal injury in young rats.

METHODS: Eighteen-day old Wistar rats were randomly divided into normal control, model, platelet activating factor (PAF) antagonist prevention and treatment groups. The model of endotoxemia of young rats was established by intraperitoneal injection of endotoxin (5 mg/kg *E coli* O₅₅: B₅ lipopolysaccharide, LPS). The rats in PAF prevention and treatment group were administered with PAF antagonist 0.5 h before

and after modeling, respectively. The animals were killed 1.5, 3, 6, 24, 48, and 72 h after LPS injection. The pathological changes of gastric mucosa were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The content of PGE₂ was measured by radioimmunoassay method.

RESULTS: The pathological changes of gastric mucosa were significant 6 h after LPS injection. Erosion, bleeding and necrosis of gastric mucosa were observed. Swelled epithelial cells and developing degeneration were also observed. However, no remarkable changes occurred in both PAF antagonist groups. In model group, the level of PGE₂ in gastric mucosa were significantly lower than that in the control (134.5 ± 9.3 μg/L vs 245.1 ± 8.9 μg/L, *P* < 0.01) 6 h after LPS injection. In PAF antagonist prevention and treatment groups, the levels of PGE₂ were markedly higher than those in the model and control group (304.4 ± 15.0, 315.9 ± 43.7 μg/L vs 134.5 ± 9.3, 245.1 ± 8.9 μg/L, *P* < 0.01 or *P* < 0.05) 6 h after LPS injection.

CONCLUSION: The level of PGE₂ in gastric mucosa is significantly decreased in endotoxemia, but it can be improved by PAF antagonist. PGE₂ has protective effect against LPS-induced acute gastric mucosal injury in young rats.

Key Words: Gastric mucosal injury; Lipopolysaccharide; Prostaglandin E₂; Platelet activating factor; PAF antagonist

Liu CY, Wang LJ, Sun M, Zhao X, Hu Y, Zhao YJ, Li J. Change of prostaglandin E₂ and effect of platelet activating factor antagonist on prostaglandin E₂ in endotoxin-induced acute gastric mucosal injury in young rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):163-166

摘要

目的: 探讨前列腺素E₂(PGE₂)在内毒素(LPS)腹腔注射(ip)诱导的幼鼠急性胃黏膜损伤中的保护作用。

■背景资料

急性胃黏膜损伤是严重感染、外伤、休克等危重症的常见并发症,在上述疾病中发病率可高达60%-100%,未经治疗者大出血率达15%,常常危及生命。

■研究前沿

目前认为急性胃黏膜损伤发生原因是由于胃黏膜保护机制削弱, 损伤因素相对增强所致。近年研究发现前列腺素 E_2 (PGE $_2$)在胃黏膜损伤的保护和修复方面发挥重要作用。

方法: 18日龄Wistar大鼠, 随机分为对照组、LPS组、PAF受体拮抗剂预防组和治疗组四组。用内毒素(*E. coli* O $_{55}$: B $_5$ 脂多糖)5 mg/kg ip制备幼年大鼠内毒素血症模型, 同等量生理盐水ip为对照组, 于注射后1.5, 3, 6, 24, 48, 72 h处死动物, 大体及光学显微镜下观察胃黏膜损伤情况, 用放射免疫方法测定胃黏膜PGE $_2$ 浓度。观察分别于内毒素ip前和注射后0.5 h应用血小板活化因子(PAF)受体拮抗剂BN52021(GinkgolideB)5 mg/kg ip对胃黏膜损伤和胃黏膜PGE $_2$ 浓度影响。

结果: 内毒素组6 h胃黏膜损伤最重, 黏膜表面可见大片糜烂、出血、条索状坏死, 光镜下上皮脱落, 黏膜内有出血, 核碎裂、固缩, 凋亡小体出现; 应用PAF受体拮抗剂后黏膜表面上皮仅见充血水肿, 光镜下损伤仅限于黏膜上皮; 内毒素组6 h胃黏膜PGE $_2$ 浓度最低, 此时PGE $_2$ 浓度在LPS组($134.5 \pm 9.3 \mu\text{g/L}$)与对照组($245.1 \pm 8.9 \mu\text{g/L}$)间差异显著($P < 0.01$); 在PAF受体拮抗剂预防组($304.4 \pm 15.0 \mu\text{g/L}$)、PAF受体拮抗剂治疗组($315.9 \pm 43.7 \mu\text{g/L}$)与LPS组($134.5 \pm 9.3 \mu\text{g/L}$)间均差异显著($P < 0.01$); PAF受体拮抗剂预防组($304.4 \pm 15.0 \mu\text{g/L}$)和治疗组($315.9 \pm 43.7 \mu\text{g/L}$)与对照组($245.1 \pm 8.9 \mu\text{g/L}$)间差异显著($P < 0.05$)。

结论: 内毒素血症时胃黏膜PGE $_2$ 下降, PAF受体拮抗剂可以改善这种PGE $_2$ 下降; PGE $_2$ 对内毒素造成的幼鼠急性胃黏膜损伤有保护作用。

关键词: 胃黏膜损伤; 内毒素; 前列腺素 E_2 ; 血小板活化因子; PAF受体拮抗剂

刘春英, 王丽杰, 孙梅, 赵恂, 胡月, 赵雅娟, 李军. PGE $_2$ 在内毒素诱导的幼鼠急性胃黏膜损伤中的变化及PAF受体拮抗剂对其影响. 世界华人消化杂志 2006;14(2):163-166
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/163.asp>

0 引言

急性胃黏膜损伤是严重感染、外伤、休克等危重症的常见并发症, 在上述疾病中发病率可高达60%-100%; 未经治疗者大出血率达15%, 常常危及生命^[1]。其发生原因是由于胃黏膜保护机制削弱, 损伤因素相对增强所致^[2]。近年研究发现前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2 , PGE $_2$)在胃黏膜损伤的保护和修复方面发挥重要作用^[3]。我们通过给幼年大鼠腹腔注射(intraperitoneal injection, ip)内毒素(lipopolysaccharide, LPS), 在内毒素血症时观察幼鼠急性胃黏膜损伤, 探讨在急性胃黏

膜损伤和修复过程中, 以及应用血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)受体拮抗剂后胃黏膜PGE $_2$ 浓度变化, 研究PGE $_2$ 对急性胃黏膜损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康18日龄Wistar大鼠, 平均体质量 $32.37 \pm 6.32 \text{ g}$, 与母鼠共同饲养(由中国医科大学第二临床学院实验动物中心提供)。内毒素O $_{55}$: B $_5$ 脂多糖为美国Sigma公司产品, PAF受体拮抗剂BN52021(GinkgolideB)为美国Sigma公司产品。PGE $_2$ 放射免疫试剂盒购于北京东亚免疫研究所。液体闪烁计数器(美国BECKMAN)。

1.2 方法 随机分为对照组、LPS组、PAF受体拮抗剂预防组和治疗组四组, 每组每一时相点(1.5, 3, 6, 24, 48, 72 h)各8只。对照组仅生理盐水1 mL/kg ip; LPS组内毒素(O $_{55}$: B $_5$ 脂多糖)5 mg/kg ip, 配比浓度5 g/L, 用生理盐水溶解。PAF受体拮抗剂预防组于内毒素ip前0.5 h、治疗组于内毒素ip后0.5 h给予PAF受体拮抗剂BN52021(GinkgolideB)5 mg/kg ip。用药后各组均放回鼠笼, 继续哺乳。分别于内毒素ip后1.5, 3, 6, 24, 48, 72 h处死动物, 迅速开腹取胃, 沿胃大弯剪开, 大体观察胃黏膜损伤情况, 在腺胃区胃大弯处取 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 胃组织置入40 g/L甲醛溶液中固定24 h, 常规石蜡包埋、切片、H-E染色光学显微镜检查。其余部分用生理盐水冲洗3次, 深低温冰箱-70℃保存。胃黏膜PGE $_2$ 浓度测定: 取低温保存腺胃区黏膜20 mg, 制成100 g/L匀浆, 离心, 取上清液, -20℃以下保存; 测量时将上清液中加入重蒸馏乙酸乙酯, 混匀, 离心, 吸取上清液, 按试剂盒说明PGE $_2$ 放免测定加液程序加入 ^3H 标记物等试剂, 离心后将上清液倒入预先加有闪烁液的瓶中, 在液体闪烁计数器上测放射性。根据放射性得出PGE $_2$ 浓度。

统计学处理 连续数据以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 使用SPSS 10.0软件系统对实验结果进行统计学分析, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 病理形态学观察 大体观察见LPS组1.5 h胃黏膜轻度水肿, 3 h胃黏膜充血、水肿, 6 h黏膜表面可见大片糜烂、出血、条索状坏死, 与胃纵轴平行, 损伤主要见于腺胃区, 窦部少见, 前胃部无损伤, 24 h黏膜糜烂、出血、坏死灶陈旧、缩小, 48 h黏膜轻度萎缩, 72 h胃黏膜基本恢复

表1 PGE₂在各组间各时间段浓度水平(mean ± SD, n = 8) (μg/L)

分组	PGE ₂					
	1.5 h	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
对照组	225.3 ± 21.1	239.2 ± 12.5	245.1 ± 8.9	263.6 ± 13.1	246.1 ± 9.7	269.0 ± 23.6
LPS组	216.9 ± 66.1	195.7 ± 22.1	134.5 ± 9.3 ^b	236.7 ± 62.2	250.2 ± 14.0	223.4 ± 7.6
预防组	235.0 ± 20.0	276.0 ± 64.0	304.4 ± 15.0 ^{da}	278.3 ± 24.6	262.7 ± 32.4	247.0 ± 11.2
治疗组	213.0 ± 34.5	252.2 ± 21.0	315.9 ± 43.7 ^{da}	295.9 ± 43.7	276.4 ± 69.5	267.4 ± 87.4

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; ^dP<0.01 vs LPS 6 h组

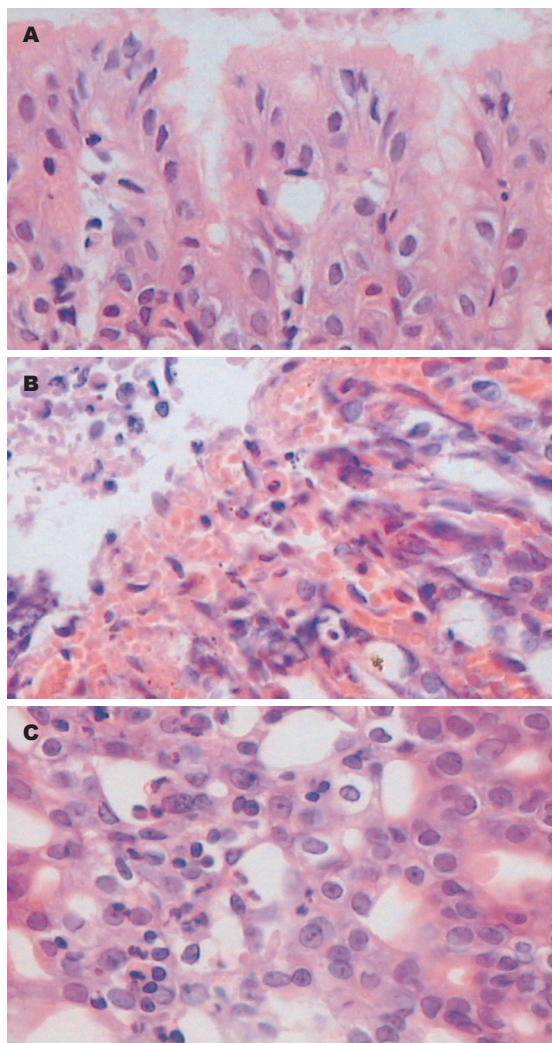


图1 胃HE染色(×400). A: 正常; B: 内毒素ip后6 h; C: 使用AFP拮抗剂后再内毒素ip后6 h.

正常; 光镜下1.5 h 黏膜上皮细胞水肿, 3 h组织充血、水肿, 6 h胃黏膜损伤最重, 黏膜表面上皮广泛脱落, 黏膜内有出血, 炎性细胞浸润, 核碎裂、固缩, 凋亡小体出现, 腺体受损, 24 h上皮脱落、中性粒细胞浸润, 48 h黏膜层变薄、腺体少, 72 h未见明显异常. PAF受体拮抗剂预防组和治疗组6 h仅见胃黏膜充血水肿, 镜下见黏膜上皮细胞肿胀、充血. 对照组胃黏膜表面上皮隐窝细胞形态学正常, 腺体结构完整(图1).

2.2 PGE₂浓度 LPS组6 h PGE₂浓度最低, 此时PGE₂浓度在LPS组(134.5 ± 9.3 μg/L)与对照组(245.1 ± 8.9 μg/L)间差异显著(P<0.01); 在PAF受体拮抗剂预防组(304.4 ± 15.0 μg/L)、PAF受体拮抗剂治疗组(315.9 ± 43.7 μg/L)与LPS组(134.5 ± 9.3 μg/L)间均差异显著(P<0.01); PAF受体拮抗剂预防组(304.4 ± 15.0 μg/L)和治疗组(315.9 ± 43.7 μg/L)间无明显差异(P>0.05); 在PAF受体拮抗剂预防组(304.4 ± 15.0 μg/L)、PAF受体拮抗剂治疗组(315.9 ± 43.7 μg/L)与对照组(245.1 ± 8.9 μg/L)间均差异显著(P<0.05)(表1).

3 讨论

前列腺素(PG)是一种脂质, 主要在精囊、肾髓质、肺和胃肠道中合成^[4]. PG不在细胞内贮存, 而在分泌瞬间合成, PG的产生和释放是由于组织损害的结果^[5]. 早在1978年Robert *et al*^[6]首先观察到PG可以抑制胃酸分泌, 且非抗酸剂量的PG可以完全防止酒精、强酸、强碱等物质引起的急性胃黏膜损伤. 国外大量资料证实十二指肠溃疡患者胃窦部及十二指肠球部黏膜PGE₂含量下降, 溃疡活动期下降明显^[7]. 本实验腹腔注射内毒素后6 h胃黏膜损伤最重, PGE₂浓度最低; 此后, PGE₂浓度逐渐上升, 胃黏膜损伤逐渐愈合. 因此, 内毒素血症时急性胃黏膜损伤可能与PGE₂合成抑制有关, PG的不断产生和释放对胃黏膜细胞起保护作用, 促进胃黏膜细胞愈合.PG对胃黏膜的保护作用在多种动物模型中得到证实, 这种不依赖于抗酸的作用Robert *et al*^[8]称之为“细胞保护”. 文献[9]报道PG可能通过刺激胃黏液的生成和分泌, 促进HCO₃⁻的分泌, 增加表面磷脂的生成, 加强胃黏膜屏障的疏水性; 以及保护胃黏膜微循环结构的完整, 维持胃黏膜血液供应, 保护增殖区细胞, 促进黏膜上皮的更新及修复和抑制胃运动过强等机制来实现对胃黏膜保护作用. PG在胃黏膜保护机制中居中心地位, 起到加强其他因素的作用.

■ 相关报道

早在1978年Robert *et al*首先观察到前列腺素可以抑制胃酸分泌, 可以防止酒精、强酸、强碱等物质引起的急性胃黏膜损伤. 2002年姚新生 *et al*观察了应激性溃疡中血小板活化因子的变化及银杏叶提取物的防治作用.

■应用要点

内毒素血症时胃黏膜PGE₂下降, PAF受体拮抗剂可以改善这种PGE₂下降; PGE₂对内毒素造成的幼鼠急性胃黏膜损伤有保护作用. PGE₂及PAF受体拮抗剂可用于防治内毒素造成急性胃黏膜损伤.

PAF是迄今发现的内源性溃疡形成介质中最强的一个, 作为炎性细胞因子放大网络中心放大器, 对其他炎性细胞因子的作用起增强作用^[10]. 目前认为PAF引起胃黏膜损害主要与以下因素有关: (1)通过增加血管通透性, 引起血压下降和缩血管作用, 减少胃黏膜血流量; (2)作用于胃肠道中的中性粒细胞, 使其活化、黏附、游出, 通过"呼吸爆发"产生氧自由基、白三烯(LT3)等炎性介质, 释放消化酶, 引起胃肠道黏膜损害; (3)在PAF、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素1(IL-1)和粒单核细胞克隆刺激因子等诱导、合成、释放和协同作用中, 启动血管组织损伤的正反馈机制, PAF和TNF在开始阶段起关键作用^[11]. 已经证明, 巨噬细胞、中性粒细胞、血小板、嗜酸性粒细胞、肥大细胞等受到内毒素刺激后产生PAF^[12,13]. PAF受体拮抗剂能显著改变内毒素或PAF引起的血流动力学改变及组织器官的损伤, 还可抑制花生四烯酸类介质的释放和氧自由基的产生^[14,15]. 本实验中预先及腹腔注射内毒素后给予PAF受体拮抗剂, 减轻了内毒素诱导的幼鼠急性胃黏膜损伤, 改善了胃黏膜PGE₂的浓度. 因此, PAF受体拮抗剂可能通过增加胃黏膜PGE₂的浓度来保护胃黏膜.

总之, 内毒素血症可致幼鼠急性胃黏膜损伤, 胃黏膜PGE₂下降, PAF受体拮抗剂可减轻内毒素诱导的幼鼠急性胃黏膜损伤, 改善胃黏膜PGE₂的浓度. PGE₂对内毒素造成的幼鼠急性胃黏膜损伤有保护作用.

4 参考文献

- 1 曾冬竹, 余佩武, 蔡志民. 严重腹腔感染时急性胃黏膜

- 损伤的实验研究. 重庆医学 2002; 31: 288-290
- 2 夏敏, 陶嘉泳, 俞蔼谣. 急性胃黏膜损伤的机制研究. 上海第二医科大学学报 2001; 21: 517-519
- 3 Chiou SK, Tanigawa T, Akahoshi T, Abdelkarim B, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin: a novel target for indomethacin-induced gastric injury. *Gastroenterology* 2005; 128: 63-73
- 4 王长洪. 前列腺素与胃黏膜病变. 中国中西医结合脾胃杂志 1995; 3: 50-51
- 5 Konturek SJ, Bowman J, Lancaster C, Hanchar AJ, Robert A. Cytoprotection of the canine gastric mucosa by prostaglandins possible mediation by increased mucosal blood flow. *Gastroenterology* 1979; 76: 1173
- 6 Robert A, Lancaster C, Hanchar AJ, Nezamis JE. Mild irritant prevent gastric necrosis through prostaglandin formation: histological study. *Gastroenterology* 1978; 74: 1086
- 7 陈宝文, 林兆鑫, 曹之宪, 许伟武, 陆照棠. 适应性细胞保护作用-弱刺激剂预防胃损伤和缺血是通过前列腺素介导的. 中华消化杂志 1994; 14: 26-29
- 8 Robert A, Lancaster C, Nezamis JE, Hanchar AJ. cytoprotection. prostaglandins, exogenous or endogenous, can maintain gastric secretory function. *Gastroenterology* 1978; 74: 1086
- 9 吴灵飞, 郑万强. 前列腺素对阿司匹林诱发大鼠急性胃黏膜损伤的保护作用. 汕头大学医学院学报 1996; 1: 28-31
- 10 Montruccio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2000; 80: 1669-1699
- 11 Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 2000; 39: 41-82
- 12 姚新生, 孙万邦, 谢正军. 应激性溃疡中血小板活化因子的变化及银杏叶提取物的防治作用的实验研究. 中华消化杂志 2002; 22: 319-320
- 13 姚新生, 孙万邦. 血小板活化因子的生理、病理作用及机制. 国外医学 生理、病理科学与临床分册 2002; 21: 61-64
- 14 吕礼应, 康格非. 血小板活化因子受体拮抗剂的抗内毒素肝损伤作用研究. 中国病理生理杂志 1997; 14: 685-688
- 15 夏国栋, 夏时海. 血小板活化因子受体的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 381-384

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

慢性乙型肝炎患者高迁移率族蛋白1 mRNA的表达及其临床意义

彭建平, 范学工, 刘洪波

彭建平, 范学工, 刘洪波, 中南大学湘雅医院感染病科 湖南省长沙市 410008

彭建平, 女, 1979-10-13生, 湖南华容人, 汉族, 2003年湘雅医学院本科毕业, 现为湘雅医院2003级在读硕士研究生。

通讯作者: 范学工, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院感染病科. xgfan@hotmail.com

电话: 0731-4327392 传真: 0731-4327332

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-12-02

Expression of high mobility group box-1 protein mRNA in patients with chronic hepatitis B and its clinical significance

Jian-Ping Peng, Xue-Gong Fan, Hong-Bo Liu

Jian-Ping Peng, Xue-Gong Fan, Hong-Bo Liu, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgfan@hotmail.com

Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-12-02

Abstract

AIM: To investigate the expression and clinical significance of high mobility group box-1 protein (HMGB1) mRNA in chronic hepatitis B.

METHODS: The expression of HMGB1 mRNA was detected in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 54 patients with chronic hepatitis B and 10 normal controls by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The levels of plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) and lipopolysaccharide (LPS) were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) simultaneously. The levels of total bilirubin (TBIL) prothrombin time activity percentage (PTA) were examined by biochemical methods.

RESULTS: HMGB1 mRNA expression was significantly increased in severe hepatitis patients in comparison with that in chronic

hepatitis B patients and normal controls (0.89 ± 0.06 vs 0.70 ± 0.10 , 0.58 ± 0.08 , $P < 0.01$). Marked difference also existed between the latter two (0.70 ± 0.10 vs 0.58 ± 0.08 , $P < 0.01$). Of the 23 patients with chronic severe hepatitis, the HMGB1 mRNA levels in 11 unrecovered patients were notably higher than those in 12 recovered patients (0.93 ± 0.04 vs 0.85 ± 0.05 , $P < 0.01$). Of the 12 recovered patients, the levels of HMGB1 mRNA were significantly decreased in the stage of recovery as compared with those in the stage of onset (0.72 ± 0.07 vs 0.85 ± 0.05 , $P < 0.01$). There was positive correlation among HMGB1 mRNA expression and plasma LPS, TNF- α and TBIL ($r = 0.74$, 0.64 , 0.71 respectively, $P < 0.01$) and negative correlation between HMGB1 mRNA expression and PTA ($r = -0.82$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: HMGB1 plays an important role in the pathogenesis of chronic hepatitis B, and HMGB1 mRNA level is closely associated with the condition the disease.

key words: High mobility group box-1; Chronic hepatitis B

Peng JP, Fan XG, Liu HB. Expression of high mobility group box-1 protein-mRNA in patients with chronic hepatitis B and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(2):167-172

摘要

目的: 通过检测慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞 (PBMCs) 高迁移率族蛋白1 (HMGB1) mRNA的表达情况, 研究HMGB1在乙型肝炎中的临床意义。

方法: 应用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 对54例慢性乙型肝炎患者和10例健康对照者PBMCs HMGB1 mRNA的表达进行检测, 同时应用ELISA法检测外周血浆肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和内毒素 (LPS) 水平, 比较各组HMGB1 mRNA表达水平的差异及其与

■背景资料

高迁移率族蛋白-1 (HMGB1) 于1970年代在小牛胸腺中被发现, 是一种含量丰富的核蛋白, 分子量约30 kD。近年研究发现, 当受内毒素 (LPS) 及细胞因子等刺激时, HMGB1即能释放到胞外, 具有细胞因子活性, 介导炎症反应。目前对于HMGB1在乙型肝炎患者中的作用情况尚未见有报道, 本实验通过检测慢性乙肝患者PBMCs HMGB1-mRNA的表达情况对此进行了初步探讨。

■研究前沿

目前HMGB1的研究主要集中在脓毒症。

TNF- α 、LPS、总胆红素(TBIL)、凝血酶原活动度(PTA)的关系。

结果: PBMCs HMGB1 mRNA的表达水平在慢性重型肝炎组分别高于慢性肝炎组(0.89 ± 0.06 vs 0.70 ± 0.10 , $P < 0.01$)和正常对照组(0.89 ± 0.06 vs 0.58 ± 0.08 , $P < 0.01$), 慢性肝炎组高于正常对照组(0.70 ± 0.10 vs 0.58 ± 0.08 , $P < 0.01$)。在23例慢性重型肝炎患者中, 11例未恢复患者PBMCs HMGB1 mRNA表达水平明显高于12例恢复的患者(0.93 ± 0.04 vs 0.85 ± 0.05 , $P < 0.01$)。其中12例已恢复的慢性重型肝炎患者, 患者恢复期PBMCs HMGB1 mRNA的表达水平较发病期明显下降(0.72 ± 0.07 vs 0.85 ± 0.05 , $P < 0.01$)。HMGB1 mRNA表达水平与外周血浆LPS、TNF- α 及TBIL均呈显著正相关($r = 0.74, 0.64, 0.71$, 均 $P < 0.01$), 与PTA呈负相关($r = -0.82$, $P < 0.01$)。

结论: HMGB1在乙型肝炎发病过程中可能起重要作用, HMGB1 mRNA的表达水平高低与病情轻重密切相关。

关键词: 高迁移率族蛋白1; 慢性乙型肝炎

彭建平, 范学工, 刘洪波. 慢性乙型肝炎患者高迁移率族蛋白1 mRNA的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2005;13(2):167-172

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/167.asp>

0 引言

1999年, Wang *et al*^[1]首次报道高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)作为新的潜在的晚期炎症介质, 参与了脓毒症的发病过程, 是内毒素致死效应的晚期重要炎症介质。此后, HMGB1成为研究的热点, 大量的文献报道HMGB1在脓毒症的发病过程中起着非常重要的作用^[2-5]。目前对于HMGB1在慢性乙型肝炎中的作用情况尚未见有报道, 我们通过检测慢性乙肝患者外周血单个核细胞(PBMCs) HMGB1 mRNA的表达情况, 对此进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 收集慢性乙型肝炎患者54例, 为我科2005-04/09住院患者。其中重型肝炎23例, 慢性肝炎31例(包括慢性重度10例, 慢性中度11例, 慢性轻度10例)。男性44例, 女性10例, 年龄18-71岁, 平均37岁。诊断符合2000-09中华传染病与寄

生虫病学分会、肝病学会西安会议标准^[6]。另收集健康志愿者10例, 作为正常对照。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 抽取清晨空腹静脉血5 mL, 肝素抗凝, 立即离心(1 500 r/min)20 min。吸取上层血浆100 μ L用于测肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 10 μ L用于测内毒素(LPS), 余下的用于分离PBMCs。

1.2.2 PBMCs的分离 取上述肝素抗凝血, 用Hank's液对倍稀释, 沿管壁缓缓加入含淋巴细胞分离液的试管上层, 保持界面分层清晰, 室温下2 000 r/min离心25 min, 吸取PBMCs层。加入8 mL Hank's液洗涤细胞, 室温下1 500 r/min离心5 min, 弃上清, 得单个核细胞, 重复洗涤二次。

1.2.3 HMGB1 mRNA的检测 (1) RNA抽提: 于上述PBMCs中加入Trizol 1 mL裂解细胞5 min, 加入氯仿200 μ L, 混匀, 室温3 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g离心15 min, 吸取上清, 加入等体积异丙醇, 混匀, 室温置10 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g离心10 min, 弃上清, 加入750 mL/L DEPC乙醇1 mL, 7 500 g离心5 min, 弃去乙醇, 干燥RNA沉淀, 加入20 μ L DEPC处理水融解。(2) 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR): 于0.5 mL EP管中加入模板RNA和引物, 70 $^{\circ}$ C 5 min后冰上急冷, 依次加入dNTPs, MMLV, MMLV逆转录缓冲液, RNA酶抑制剂, 用DEPC处理水补充总体积至20 μ L。将上述反应液置于37 $^{\circ}$ C 2 h后, 95 $^{\circ}$ C热变性5 min, 冰上冷却。上述反应液用于PCR反应。上游引物为5'-GTAGAATTCATGGGCAAAGGAGATCCTA-3'; 下游引物为5'-AGGCTCGAGTTCATCATCATCATCTTCT-3', 产物长度为659 bp。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。根据PCR产物电泳条带与内参对照 β -actin(316 bp)相对强度的比例, 以确定HMGB1 mRNA表达水平。

1.2.4 LPS的检测 采用ELISA法, 试剂盒由美国TPI公司提供。

1.2.5 TNF- α 的检测 采用ELISA法, 试剂盒由上海雄森科技实业有限公司提供, 进口分装。

1.2.6 肝功能及凝血酶原活动度(PTA)的检测 与TNF- α 等测定同时留取血液标本送医院检验科用全自动生化仪测定。

统计学处理 所有数据均在SPSS 10.0软件包上进行, 实验数据用mean \pm SD表示, 各组间比较用多个样本均数间的多重比较, 假设检验采用LSD-*t*检验, 两组数据间的相关关系用直线相关分析方法, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

表1 各组HMGB1 mRNA、TNF- α 、LPS水平及肝功能指标 (mean \pm SD)

组别	<i>n</i>	HMGB1 mRNA	TNF- α (ng/L)	LPS (μ g/L)	TBIL (μ mol/L)	PTA (%)
重型肝炎组	23	0.89 \pm 0.06 ^{bc}	96.63 \pm 24.16 ^{bc}	38.41 \pm 17.82 ^{bc}	443.16 \pm 154.41 ^{bc}	38.57 \pm 11.20 ^{bc}
慢性肝炎组	31	0.70 \pm 0.10 ^b	75.26 \pm 30.24 ^b	8.69 \pm 6.67	66.83 \pm 60.85 ^b	74.21 \pm 13.46 ^b
正常人组	10	0.58 \pm 0.08	16.36 \pm 5.00	2.45 \pm 1.66	10.24 \pm 2.31	90.70 \pm 7.21

^b*P* < 0.01 vs 正常人组; ^c*P* < 0.01 vs 慢性肝炎组。表2 慢性肝炎各组HMGB1 mRNA、TNF- α 、LPS水平及肝功能指标 (mean \pm SD)

组别	<i>n</i>	HMGB1 - mRNA	TNF- α (ng/L)	LPS (μ g/L)	TBIL (μ mol/L)	PTA (%)
重度肝炎组	10	0.79 \pm 0.08 ^{bc}	90.91 \pm 23.27 ^{bc}	16.81 \pm 10.94 ^{bc}	135.33 \pm 62.23 ^{bc}	61.15 \pm 12.59 ^{bc}
中度肝炎组	11	0.66 \pm 0.09	68.87 \pm 37.84	6.21 \pm 3.16	44.92 \pm 19.80	76.28 \pm 9.87 ^c
轻度肝炎组	10	0.65 \pm 0.09	66.63 \pm 22.62	3.23 \pm 2.25	22.46 \pm 6.89	85.00 \pm 3.68

^b*P* < 0.01 vs 中度肝炎组; ^c*P* < 0.01 vs 轻度肝炎组。表3 重型肝炎恢复组与未恢复组HMGB1 mRNA、TNF- α 、LPS水平及肝功能指标 (mean \pm SD)

组别	<i>n</i>	HMGB1 - mRNA	TNF- α (ng/L)	LPS (μ g/L)	TBIL (μ mol/L)	PTA (%)
未恢复组	11	0.93 \pm 0.04 ^b	96.76 \pm 21.78	46.96 \pm 20.11 ^a	476.99 \pm 163.75	31.64 \pm 7.83 ^b
恢复组	12	0.85 \pm 0.05	104.48 \pm 17.44	31.66 \pm 12.10	407.64 \pm 147.50	44.67 \pm 10.00

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 恢复组。表4 重型肝炎发病期与恢复期HMGB1 mRNA、TNF- α 、LPS水平及肝功能指标 (mean \pm SD)

组别	<i>n</i>	HMGB1 - mRNA	TNF- α (ng/L)	LPS (μ g/L)	TBIL (μ mol/L)	PTA (%)
发病期	12	0.85 \pm 0.05 ^b	101.23 \pm 31.33 ^a	31.66 \pm 12.10 ^b	412.15 \pm 145.30 ^b	44.67 \pm 10.00 ^b
恢复期	12	0.72 \pm 0.07	72.23 \pm 43.62	11.77 \pm 8.54	124.92 \pm 57.24	55.60 \pm 7.58

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 恢复期。

2 结果

2.1 PBMCs HMGB1 mRNA的表达水平 慢性重型肝炎组、慢性肝炎组 (包括慢性重度、慢性中度、慢性轻度肝炎)和正常人组, HMGB1 mRNA表达水平有显著性差异(*P* < 0.01, 表1, 图1), 慢性重型肝炎组分别高于慢性肝炎组和正常对照组, 慢性肝炎组高于正常对照组。HMGB1 mRNA表达水平在31例慢性肝炎患者中, 慢性重度肝炎组分别高于慢性中度和慢性轻度肝炎组(*P* < 0.01), 但慢性中度和慢性轻度肝炎组之间无差异(*P* > 0.05, 表2, 图1)。在23例慢性重型肝炎患者中, 11例未恢复患者与12例恢复的患者在发病期PBMCs HMGB1 mRNA的表达水平有显著性差异(*P* < 0.01, 表3, 图2), 未恢复患者明显高于恢复的患者。追踪观察12例已恢复的慢性重型肝炎

患者, 患者恢复期PBMCs HMGB1 mRNA的表达水平较发病期明显下降, 差异有显著性(*P* < 0.01, 表4, 图2)。

2.2 外周血浆LPS、TNF- α 的水平 慢性重型肝炎、慢性肝炎组和正常对照血浆LPS水平(μ g/L)分别为: 38.41 \pm 17.82, 8.69 \pm 6.67, 2.45 \pm 1.66。其中, 慢性重型肝炎组高于慢性肝炎组和正常对照组(*P* < 0.01), 但慢性肝炎组与正常对照组无差异(*P* > 0.05, 表1)。在31例慢性肝炎中, 慢性重度分别高于慢性中度和慢性轻度肝炎组(*P* < 0.01), 但慢性中度与慢性轻度肝炎组之间无差异(*P* > 0.05, 表2)。血浆TNF- α 水平(ng/L)分别为: 96.63 \pm 24.16, 68.87 \pm 37.84, 16.36 \pm 5.00。其中, 慢性重型肝炎组分别高于慢性肝炎组和正常对照组, 慢性肝炎组高于正常对照组

■ 相关报道

- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-251
- achot A, Monneret G, Voirin N, Leissner P, Venet F, Bohe J, Payen D, Biennu J, Mougin B, Lepape A. Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin Immunol* 2005; 114: 61-69

■应用要点

HMGB1是晚期炎症介质,在炎症反应中持续时间较长,即使在疾病后期,血液 HMGB1 仍然维持较高的水平,基于这一特点, HMGB1有可能成为评价重型肝炎严重程度更为方便、实用的指标,亦可能成为临床干预治疗措施新的、更为实用的靶点。

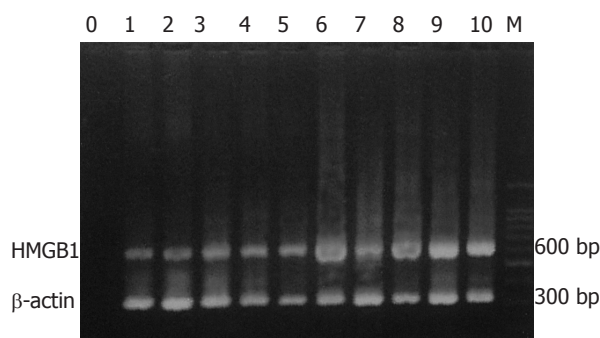


图1 各组PBMCs HMGB1 mRNA表达基因扩增片断电泳图. HMGB1目标片断659 bp, β -actin目标片断316 bp.

表5 各指标直线相关分析

	HMGB1	TNF- α	LPS	TBIL	PTA
HMGB1	1	0.64 ^b	0.74 ^b	0.71 ^b	-0.82 ^b
TNF- α	0.64 ^b	1	0.43 ^b	0.50 ^b	-0.58 ^b
LPS	0.74 ^b	0.43 ^b	1	0.79 ^b	-0.82 ^b

^b $P < 0.01$.

($P < 0.01$, 表1). 在31例慢性肝炎中, 慢性重度高于慢性中度和慢性轻度肝炎组($P < 0.01$), 但慢性中度与慢性轻度肝炎组之间无差异($P > 0.05$, 表2). 在23例慢性重型肝炎患者中, 11例未恢复患者与12例恢复的患者在发病期血浆LPS水平差异显著($P < 0.05$), 但血浆TNF- α 水平却无差异($P > 0.05$, 表3). 追踪观察12例已恢复的重型肝炎患者, 患者恢复期血浆LPS及TNF- α 水平较发病期明显下降, 差异有显著性($P < 0.05$, 表4).

2.3 PBMCs HMGB1 mRNA表达水平与外周血浆LPS、TNF- α 、TBIL及PTA的关系 HMGB1 mRNA表达水平与外周血浆LPS、TNF- α 及TBIL均呈显著正相关($r = 0.74, 0.64, 0.71, P$ 均 < 0.01); 与PTA呈负相关($r = -0.82, P < 0.01$, 表5).

3 讨论

HMGB1是在1970年代发现^[7], 因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中有很高的迁移率而得名, 是普遍存在于各种细胞核及细胞质中的高度保守的蛋白. HMGB1分布十分广泛, 多种器官(如淋巴组织、脑、肝、肺、心、脾、肾等)的细胞中均有表达, 正常时位于大多数细胞的胞核和胞浆内, 他可参与DNA的复制、细胞分化及基因表达等多种细胞生命活动^[8-9]. 新近研究发现, 当受LPS及细胞因子等刺激时, HMGB1即能释放到胞外^[10-11], 具有细胞因子活性, 介导炎症反应.

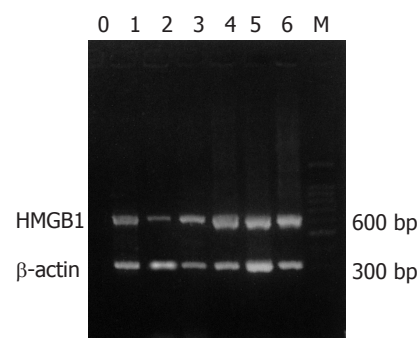


图2 重型肝炎PBMCs HMGB1 mRNA表达基因扩增片断电泳图. 0: 空白对照; 1、2: 重型肝炎恢复期; 3、4: 重型肝炎恢复者发病期; 5、6: 重型肝炎未恢复者发病期; M: 100 bp 梯度DNA分子量标准.

与TNF- α 等早期炎症介质不同, HMGB1于炎症反应晚期出现, 持续时间长, 被视为晚期炎症介质^[12], 参与了脓毒症、内毒素血症的病理生理过程. 1999年, Wang *et al*^[11]首先运用免疫印迹法测定血清HMGB1水平, 发现脓毒症患者血清HMGB1明显升高, 且未存活者明显高于存活者, 而正常人血清中却测不到. 近来又有学者动态观察了42例脓毒性休克患者, 运用实时RT-PCR的方法测定其外周血HMGB1 mRNA表达水平, 并与18例健康人比较, 发现脓毒性休克患者外周血HMGB1 mRNA水平明显高于健康人^[13]. 此外, HMGB1还与急性肺损伤^[14-16]、肝脏缺血再灌注损伤^[17-18]、关节炎^[19-20]、滑膜炎、心率失常、动脉粥样硬化^[21]、胃肠道肿瘤^[22-23]及中枢神经系统病变^[25-26]等有关.

乙型肝炎是我国常见病、多发病, 其治疗难度大, 费用高, 尤其是重型肝炎, 因其易并发严重感染、肝性脑病、肝肾综合征、出血等, 病死率极高. 乙型肝炎的发病机制中, 除了病毒的直接作用外, 还有肝损伤后继发引起的肠源性内毒素血症, 以及由内毒素介导产生的细胞因子和炎症介质对肝脏的毒性作用和造成的微循环障碍, 而重症肝炎在急性炎症反应的过程中与脓毒血症一样, 都存在全身炎症综合反应, 进而发展为多器官功能衰竭甚至死亡. 目前对于HMGB1在乙型肝炎中的作用情况尚未见有报道, 我们通过检测乙肝患者PBMCs HMGB1 mRNA的表达情况对此进行了初步探讨.

本组资料显示, HMGB1 mRNA表达水平在慢性重型肝炎组高于慢性肝炎组和正常对照组, 慢性肝炎组高于正常对照组. 且在31例慢性肝炎患者中, 慢性重度高于慢性中度和慢性轻度肝炎组. HMGB1 mRNA表达水平与外周血浆内

毒素、TNF- α 及TBIL均呈显著正相关,与PTA呈负相关.说明HMGB1与内毒素、TNF- α 等一样,在乙型肝炎发病过程中起着非常重要的作用,并与病情的严重程度密切相关.

比较23例慢性重型肝炎患者,发现未恢复的患者发病期PBMCs HMGB1 mRNA表达水平明显高于恢复的患者.追踪观察这12例已恢复的患者,发现恢复期HMGB1 mRNA表达水平较发病期有明显的下降,该变化与TNF- α 、LPS、TBIL、PTA的改变一致,说明HMGB1与TNF- α 、LPS、TBIL、PTA等一样,能反应乙型肝炎病情的严重程度、预后及其转归.

同时发现,血浆LPS水平在慢性肝炎组和正常人组之间比较无显著性差异,而HMGB1 mRNA在这2组之间却有差异.其原因可能是慢性肝炎患者肝脏损伤并不严重,肝脏的屏障保护功能未被破坏,使得从肠道来的细菌及内毒素得以清除,故内毒素血症并不明显,所以血浆LPS在这2组患者之间无明显差异.而HMGB1作为晚期炎症介质,除受到LPS刺激产生外,TNF- α 、IL-1等细胞因子亦能刺激免疫细胞产生HMGB1,而HMGB1反过来又能刺激TNF- α 、IL-1等细胞因子的产生^[27-30],他们之间相互诱导,相互促进,从而使炎症反应不断得以放大、加重,导致HMGB1水平升高,使得慢性肝炎组HMGB1 mRNA高于正常人.

我们还发现,在23例慢性重型肝炎患者中,TNF- α 在未恢复患者与恢复的患者在发病期水平无差异,而HMGB1 mRNA在这两组组之间表达有差异.其原因可能是未恢复的重型肝炎患者虽然病情很重,且免疫反应亦十分强烈,但TNF- α 为炎症反应早期的细胞因子,持续时间短,到了疾病后期,血清TNF- α 水平已很低,从而导致以上的结果.有资料证实,以致死量的内毒素攻击小鼠,部分动物5 d后才死亡,而此时TNF- α 水平早已恢复至正常范围^[16].所以过去采取TNF- α 拮抗剂治疗重型肝炎并未取得满意效果,其原因就可能与疾病初期致炎细胞因子迅速合成与释放,临床治疗难以做到早期或预防性干预有关.而HMGB1则不同,他是晚期炎症介质,在炎症反应中持续时间长,即使在疾病后期,血液HMGB1仍然维持较高的水平,基于这一特点, HMGB1有可能成为评价重型肝炎严重程度更为方便、实用的指标,亦可能成为临床干预治疗措施新的、更为实用的靶点.我们仅从基因水平研究了慢性乙肝患者中HMGB1

的变化,今后的工作将进一步从蛋白水平证实HMGB1在慢性乙型肝炎中的作用.

4 参考文献

- 1 Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-251
- 2 Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 296-301
- 3 Sundén-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, Rauvala H, Herman G, Tracey KJ, Lee ML, Andersson J, Tokics L, Treutiger CJ. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2005; 33: 564-573
- 4 Chen G, Li J, Qiang X, Czura CJ, Ochani M, Ochani K, Ulloa L, Yang H, Tracey KJ, Wang P, Sama AE, Wang H. Suppression of HMGB1 release by stearyl lysophosphatidylcholine: an additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis. *J Lipid Res* 2005; 46: 623-627
- 5 Yin K, Gribbin E, Wang H. Interferon-gamma inhibition attenuates lethality after cecal ligation and puncture in rats: implication of high mobility group box-1. *Shock* 2005; 24: 396-401
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 7 Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973; 38: 14-19
- 8 Landsman D, Bustin M. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays* 1993; 15: 539-546
- 9 Melvin VS, Edwards DP. Coregulatory proteins in steroid hormone receptor action: the role of chromatin high mobility group proteins HMG-1 and -2. *Steroids* 1999; 64: 576-586
- 10 Wang H, Vishnubhakat JM, Bloom O, Zhang M, Ombrellino M, Sama A, Tracey KJ. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituitary cells. *Surgery* 1999; 126: 389-392
- 11 Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kakkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 565-570
- 12 Wang H, Yang H, Czura C J, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1768-1773
- 13 Pachot A, Monneret G, Voirin N, Leissner P, Venet F, Bohe J, Payen D, Bienvenu J, Mougin B, Lepape A. Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock.

■创新盘点

本文研究了HMGB1 mRNA在乙型肝炎中的表达情况及其与病情严重程度及转归的关系,发现HMGB1与慢性乙肝病情严重程度正相关,能反应乙型肝炎病情的严重程度、预后及其转归.

■同行评价

本文具有较高的科学性, 创新性和可读性, 临床实用性亦较强. 不足之处是未同时检测患者血浆中的HMGB1水平, 无HMGB1蛋白水平结果.

- 14 Lutz W, Stetkiewicz J. High mobility group box 1 protein as a late-acting mediator of acute lung inflammation. *Int J Occup Med Environ Health* 2004; 17: 245-254
- 15 Kim JY, Park JS, Strassheim D, Douglas I, Diaz del Valle F, Asehnoune K, Mitra S, Kwak SH, Yamada S, Maruyama I, Ishizaka A, Abraham E. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L958-L965
- 16 Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000; 165: 2950-2954
- 17 Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005; 201: 1135-1143
- 18 Watanabe T, Kubota S, Nagaya M, Ozaki S, Nagafuchi H, Akashi K, Taira Y, Tsukikawa S, Oowada S, Nakano S. The role of HMGB-1 on the development of necrosis during hepatic ischemia and hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res* 2005; 124: 59-66
- 19 Pullerits R, Jonsson IM, Verdreng M, Bokarewa M, Andersson U, Erlandsson-Harris H, Tarkowski A. High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1693-1700
- 20 Ulloa L, Batliwalla F M, Andersson U, Gregersen PK, Tracey KJ. High mobility group box chromosomal protein 1 as a nuclear protein, cytokin, and potential therapeutic target in arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 876-881
- 21 Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, DiVitto G, Kanellakis P, Kostolias G, Ilyinskaya O, Tararak E, Bobik A. Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2320-2325
- 22 Nestl A, Von Stein OD, Zatloukal K, Thies WG, Herrlich P, Hofmann M, Sleeman JP. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 1569-1577
- 23 Poser I, Golob M, Buettner R, Bosserhoff AK. Up-regulation of HMGB1 leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 2991-2998
- 24 Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 790-802
- 25 Agnello D, Wang H, Yang H, Tracey KJ, Ghezzi P. HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. *Cytokine* 2002; 18: 231-236
- 26 O'Connor KA, Hansen MK, Rachal Pugh C, Deak MM, Biedenkapp JC, Milligan ED, Johnson JD, Wang H, Maier SF, Tracey KJ, Watkins LR. Further characterization of high mobility group box 1 (HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects. *Cytokine* 2003; 24: 254-265
- 27 Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, Suffredini AF. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003; 101: 2652-2660
- 28 Park JS, Arcaroli J, Yum HK, Yang H, Wang H, Yang KY, Choe KH, Strassheim D, Pitts TM, Tracey KJ, Abraham E. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: 870-879
- 29 Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, Tracey KJ, Chiorazzi N. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 2004; 173: 307-313
- 30 Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazzon M, Dumitriu IE, Muller S, Iannaccone M, Traversari C, Bianchi ME, Manfredi AA. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 2004; 5: 825-830

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

益肝康等活血化瘀中药抑制 IL-1 β 刺激的 HSC 增殖及 TIMP-1 的表达

赵霞, 姚希贤, 张亚平, 郑文明

赵霞, 姚希贤, 张亚平, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

郑文明, 唐山市中医院 河北省唐山市 063000

赵霞, 女, 1979-01-08生, 河北省沙河市人, 汉族, 河北医科大学消化内科在读硕士研究生, 主要研究方向为慢性肝病肝纤维化。

通讯作者: 姚希贤, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化病研究所. zhaoxia_0108@163.com

电话: 0311-87222831

收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-12-10

Yigankang inhibits proliferation of hepatic stellate cells and expression of TIMP-1 mRNA induced by interleukin-1 β

Xia Zhao, Xi-Xian Yao, Ya-Ping Zhang, Wen-Ming Zheng

Xia Zhao, Xi-Xian Yao, Ya-Ping Zhang, Department of Digestology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Wen-Ming Zheng, Tangshan Traditional Chinese Medical Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Xi-Xian Yao, Department of Digestology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhaoxia_0108@163.com

Received: 2005-09-21 Accepted: 2005-12-10

Abstract

AIM: To investigate the effects of the blood-activating and stasis-eliminating traditional Chinese medicines (TCM), including *Yigankang*, small compound of *Radix Salviae Miltiorrizae* (scRSM), and *Radix Salviae Miltiorrizae* (RSM), on the proliferation of rat hepatic stellate cells (HSCs) and expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) mRNA induced by interleukin-1 β (IL-1 β).

METHODS: The activated rat HSCs were cultured *in vitro* and then randomly divided into 8 groups, named A, B, C, D, E, F, G, and H. The rats in group A served as the controls, and those in the rest groups were treated IL-1 β (10 μ g/L), IL-1 β (10 μ g/L) plus *Yigankang* (2 g/L), IL-1 β (10 μ g/L) plus scRSM (2 g/L), IL-1 β (10 μ g/L) plus RSM (2 g/L), RSM (2 g/L), scRSM (2 g/L), and *Yigankang* (2 g/L), respectively. The proliferation of HSCs was detected by cell counting

kit-8 (CCK-8) and the expression of the TIMP-1 mRNA was detected by semi-quantitative reverse transcription chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The proliferation of HSCs and expression of TIMP-1 mRNA in group A were significantly higher than those in group F, G, H (1.291 ± 0.09 vs 1.055 ± 0.105 , 1 ± 0.07 , 0.883 ± 0.06 , $P < 0.01$; 0.591 ± 0.064 vs 0.493 ± 0.088 , 0.458 ± 0.076 , 0.356 ± 0.046 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$), and they were markedly lower in group H than those in group F and G ($P < 0.05$). The proliferation of HSCs and expression of TIMP-1 mRNA in group B were significantly increased in comparison with those in group A, C, D, and E (1.575 ± 0.017 vs 1.291 ± 0.09 , 0.906 ± 0.09 , 1.015 ± 0.081 , 1.097 ± 0.038 , $P < 0.01$; 1.369 ± 0.097 vs 0.591 ± 0.064 , 0.694 ± 0.078 , 0.854 ± 0.05 , 0.898 ± 0.12 , $P < 0.01$), but they were notably increased in group C than those in group D and E ($P < 0.05$).

CONCLUSION: *Yigankang* as well as scRSM and RSM can inhibit the IL-1 β -induced proliferation of HSCs and expression of TIMP-1 mRNA, by which it plays a protective role against liver inflammation and fibrosis. *Yigankang* is more effective than scRSM and RSM.

Key Words: *Yigankang*; *Radix Salviae Miltiorrizae*; Interleukin-1 β ; Hepatic stellate cell; Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1

Zhao X, Yao XX, Zhang YP, Zheng WM. *Yigankang* inhibits proliferation of hepatic stellate cells and expression of TIMP-1 mRNA induced by interleukin-1 β . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):173-178

摘要

目的: 探讨活血化瘀中药益肝康、丹参小复方、丹参对IL-1 β 刺激的活化的大鼠肝星状细胞(HSCs)增殖及基质金属蛋白酶抑制因子mRNA(TIMP mRNA)表达的影响。

方法: 体外培养活化的大鼠HSC, 随机分为8

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝炎向肝硬化发展的必经阶段, 随慢性肝炎的发展, 肝纤维化逐渐加重。如何阻止肝纤维化的发展并逆转至正常, 已成为治疗各种慢性肝病的中心问题。目前尚乏理想的抗纤维化西药。中医中药治疗慢性肝炎肝纤维化, 疗效显著, 且无毒性, 显示出良好趋势。故本文旨在从细胞水平研究活血化瘀中药抗肝纤维化机制, 为抗肝纤维化新药开发打下基础。

■研究前沿

对中药抗肝纤维化的分子机制的研究有以下几个方面: (1)清除自由基, 去除肝纤维化形成的诱因; (2)抑制肝HSC活化和增殖; (3)阻断ECM合成, 包括直接抑制ECM各组分的合成和修饰, 或间接抑制TGF, IL-1等细胞因子的活性; (4)促进ECM的降解, 包括提高基质金属蛋白酶(MMP)的表达和活性或降低基质金属蛋白酶(TIMPs)的表达和活性。

组: 对照组(A组)、IL-1 β 10 μ g/L(B组)、IL-1 β 10 μ g/L+益肝康2 g/L干预组(C组)、IL-1 β 10 μ g/L+丹参小复方2 g/L干预组(D组)、IL-1 β 10 μ g/L+丹参2 g/L干预组(E组)、丹参2 g/L(F组)、丹参小复方2 g/L(G组)、益肝康2 g/L(H组)。加药后24 h, 应用活细胞计数试剂盒-CCK-8检测各组HSC增殖, 采用半定量RT-PCR方法检测各组HSC TIMP-1 mRNA的表达。

结果: A组HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达强于F、G、H组(1.291 ± 0.09 vs 1.055 ± 0.105 , 1 ± 0.07 , 0.883 ± 0.06 , $P < 0.01$; 0.591 ± 0.064 vs 0.493 ± 0.088 , 0.458 ± 0.076 , 0.356 ± 0.046 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); H组HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达低于F组和G组($P < 0.05$); B组HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达均明显强于A组(1.575 ± 0.017 vs 1.291 ± 0.09 , $P < 0.01$; 1.369 ± 0.097 vs 0.591 ± 0.064 , $P < 0.01$)和C、D、E组(1.575 ± 0.017 vs 0.906 ± 0.09 , 1.015 ± 0.081 , 1.097 ± 0.038 , $P < 0.01$; 1.369 ± 0.097 vs 0.694 ± 0.078 , 0.854 ± 0.05 , 0.898 ± 0.12 , $P < 0.01$); C组HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达低于D组和E组($P < 0.05$)。

结论: 益肝康等活血化癥中药能抑制IL-1 β 刺激的HSCs增殖及TIMP-1 mRNA表达, 发挥其抗肝纤维化功效。益肝康抗肝纤维化作用强于丹参小复方和丹参单药。

关键词: 益肝康; 白细胞介素-1 β ; 肝星状细胞; 基质金属蛋白酶-1

赵霞, 姚希贤, 张亚平, 郑文明. 益肝康等活血化癥中药抑制IL-1 β 刺激的HSC增殖及TIMP-1的表达. 世界华人消化杂志 2006; 14(2): 173-178

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/173.asp>

0 引言

肝纤维化的形成是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解失衡的结果。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)为肝脏产生ECM的主要细胞, 其活化、增殖是肝纤维化发生的中心环节^[1]。目前研究表明, 肝ECM代谢主要由基质金属蛋白酶(MMP)及其抑制因子(TIMPs)所调节。白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)是在局部和全身炎症反应中起核心作用的细胞因子之一^[2]。研究表明IL-1在促进HSC活化、增殖等过程中发挥重要作用, 并促进TIMPs的表达^[3]。迄今, 以丹参等活血化癥为主中药“益肝康”、丹参小复方均已证

实有肯定的抗肝纤维化作用^[4-6], 我们观察丹参为主的益肝康等活血化癥中药对IL-1 β 刺激的大鼠HSC增殖及TIMP-1 mRNA表达的影响, 探讨其抗肝纤维化作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 肝星状细胞株CFSC由美国Greenwel教授建株并惠赠, 其表型为活化的HSCs, 从CCl₄诱发的肝硬化大鼠中分离并通过培养使细胞自发获得永生性, 冷冻保存于液氮中。IL-1 β 购自英国PeproTech公司; 活细胞计数试剂盒-CCK-8(cell counting kit-8)购自日本株式会社同仁化学研究所; 逆转录试剂盒购自Promega公司; 总RNA提取试剂(Trizol)、TaqDNA聚合酶、dNTP均购自北京赛百盛公司; TIMP-1和内参照GAPDH引物由北京赛百盛公司合成; RPMI-1640培养基购自Gibco公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物制品公司。中药购自石家庄乐仁堂。益肝康系重用丹参, 由黄芪、归尾、赤芍、白术等组成; 丹参小复方由丹参、黄芪、归尾组成。

1.2 方法

1.2.1 中药的制备 生药浸泡过夜, 反复煮三次, 药液离心去杂质, 置于旋转蒸发仪上蒸去水分。浓缩药液再次离心去杂质后按1:3体积比加入950 mL/L乙醇4℃沉淀过夜, 去除蛋白成分, 将上清药液再置于旋转蒸发仪上蒸去乙醇和水制成中药浓缩纯化液。用含10 mL/L新生牛血清的RPMI-1640培养液配置成所需浓度, 干预细胞前用滤器过滤。干预后预实验细胞用台盼蓝染色, 细胞计数活细胞数大于95%。

1.2.2 细胞培养 将冷冻保存于液氮中的HSC细胞复苏后接种于含100 mL/L新生牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素、4 mmol/L谷氨酰胺及1 mmol/L HEPES的RPMI-1640培养液中, 37℃ 50 mL/L CO₂条件下培养。当细胞呈单层致密状分布时, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化后以1:3传代, 24 h换液, 72 h再次传代用于以下试验。

1.2.3 IL-1 β 和益肝康干预HSC试验 将传代的HSC以 3.5×10^4 /L的密度100 μ L接种于96孔板或5 mL接种于25 mL培养瓶, 培养箱中孵育至细胞80%-90%汇合时, 弃培养液, 换含10 mL/L新生牛血清的RPMI-1640培养液继续培养12 h, 使细胞基本同步于G₀期。吸弃上清, 而后分为8组: (1)对照组(A组), 加含10 mL/L新生牛血清的培养液; (2)IL-1 β 10 μ g/L干预组(B组), 加含IL-

1 β 10 μ g/L的10 mL/L新生牛血清培养液; (3)IL-1 β 10 μ g/L+益肝康2 g/L干预组(C组), 加含IL-1 β 10 μ g/L、益肝康2 g/L的10 mL/L新生牛血清的培养液; (4)IL-1 β 10 μ g/L+小复方2 g/L干预组(D组), 加含IL-1 β 10 μ g/L、小复方2 g/L的10 mL/L新生牛血清的培养液; (5)IL-1 β 10 μ g/L+丹参2 g/L干预组(E组), 加含IL-1 β 10 μ g/L、2 g/L丹参的10 mL/L新生牛血清的培养液; (6)丹参2 g/L(F组), 加含丹参2 g/L的10 mL/L新生牛血清的培养液; (7)小复方2 g/L(G组), 加含小复方2 g/L的10 mL/L新生牛血清的培养液; (8)益肝康2 g/L(H组), 加含益肝康2 g/L的1 mL/L新生牛血清的培养液, 继续培养24 h。

1.2.4 活细胞计数试剂盒-CCK-8检测HSC增殖 细胞接种于96孔板上干预24 h后, 每孔加入CCK-8试剂10 μ L, 继续培养3 h后在酶标仪上读取450 nm的吸光度。用吸光度A表示。每组设6个重复孔, 另设空白孔调零^[7]。

1.2.5 半定量RT-PCR检测TIMP-1 mRNA表达 (1)RNA抽提: 用RNA抽提试剂盒按照厂家推荐的操作步骤抽提各瓶HSC的总RNA, 用分光光度计测定RNA含量及纯度, A_{260}/A_{280} 均在1.8-2.0之间。 (2)cDNA的合成: 采用25 μ L逆转录反应体系, 内含待测RNA 2 μ g, M-MLV 30 U, RNA酶抑制剂20 U, 随机引物100 pmol及适量dNTP(10 mol/L)、5 \times buffer, 37 $^{\circ}$ C反应60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min灭活M-MLV。 (3)引物: TIMP-1: 上游引物5'-TCC CCA GAA ATC ATC GAG AC-3', 下游引物5'-ATC GCT GAA CAG GGA AAC AC-3', 扩增片段长329 bp。内参照GAPDH: 上游引物5'-GGC CCC TCT GGA AAG CTG TG -3', 下游引物5'-CCG CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3', 扩增片段长239 bp。 (4)共扩增PCR反应: 反应体系为25 μ L, 内含 cDNA 4 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP(10 mol/L)1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各1.5 μ L, Taq酶2.5 U, 用水补至25 μ L。PCR反应在0.2 mL薄壁Eppendorf管中进行, 用GeneAmp 9600型PCR仪扩增。PCR反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 然后94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s(35个循环), 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。 (5)半定量分析: PCR产物在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳后用凝胶成像系统对DNA条带进行光密度扫描测定灰度值, 用TIMP-1/GAPDH灰度值比表示TIMP-1的相对表达量。

统计学处理 数据用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 利用SPSS 11.0软件进行统计分

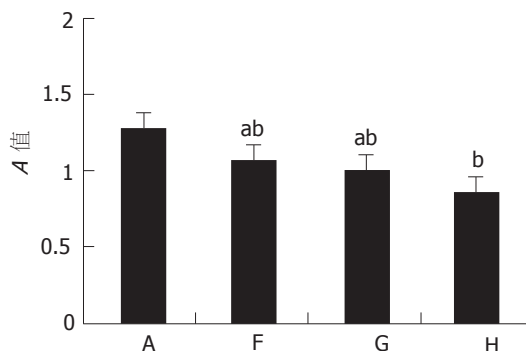


图1 益肝康等活血化瘀中药对肝星状细胞增殖的影响。A: 对照组; F: 丹参组; G: 丹参小复方组; H: 益肝康组。^a $P<0.05$ vs H组, ^b $P<0.01$ vs A组。

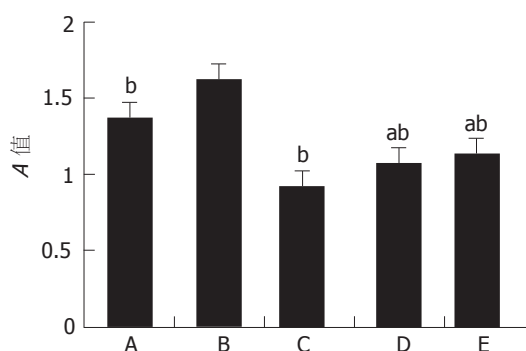


图2 益肝康等活血化瘀中药对IL-1 β 刺激的HSC增殖的影响。A: 对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β +益肝康组; D: IL-1 β +丹参小复方组; E: IL-1 β +丹参组。^a $P<0.05$ vs C组, ^b $P<0.01$ vs B组。

析。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 有显著差异者进一步用最小显著差值法进行两两比较。

2 结果

2.1 活细胞计数试剂盒-CCK-8检测HSC增殖 A组的吸光度值(1.291 ± 0.09)明显高于F组(1.055 ± 0.105 , $P<0.01$)、G组(1 ± 0.07 , $P<0.01$)、H组(0.883 ± 0.06 , $P<0.01$); H组吸光度值明显低于F组($P<0.05$)和G组($P<0.05$); F组和G组相比差别无显著性($P>0.05$)(图1)。证实益肝康等活血化瘀中药能抑制HSC增殖, 与丹参单药和丹参小复方相比组方益肝康抑制率最高, 其抗肝纤维化作用最强。B组吸光度值(1.575 ± 0.017)明显高于A组(1.291 ± 0.09 , $P<0.01$)、C组(0.906 ± 0.09 , $P<0.01$)、D组(1.015 ± 0.081 , $P<0.01$)、E组(1.097 ± 0.038 , $P<0.01$); D组、E组高于C组($P<0.05$); D组和E组相比差别无显著性($P>0.05$)(图2)。证实了IL-1 β 促HSC增殖作用, 但其作用能被益肝康等活血化瘀中药所抑制, 并且益肝康的作用强于丹参单药及丹参小复方。

■创新盘点

本文不同与其他的创新之处在于本研究除了观察了活血化瘀中药对活化的HSC的直接作用外, 还进一步观察了其对外源性IL-1刺激的HSCs的影响, 在研究其抗肝纤维化机制的同时, 证实了他在强有力的促纤维化因子的预刺激下仍发挥其强大功效, 这说明他对已形成的纤维化可能有一定的逆转作用; 亦可推测其抗肝纤维化作用的发挥可能与抑制促纤维化因子IL-1的作用有关系, 有待进一步研究。

■应用要点

本研究从活血化瘀中药对HSC与基质降解有关的关键酶TIMP影响来探讨了活血化瘀中药的抗肝纤维化的机制,还进一步比较了单味中药和中药组方的作用,结果表明组方的抗肝纤维化作用明显增强,这正符合了祖国传统医学基础理论君臣佐使合理配药这一精髓,为抗肝纤维化新药开发打下理论基础。

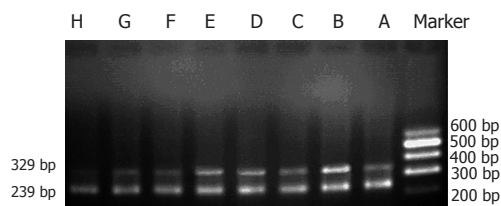


图3 各组HSC TIMP-1 mRNA经RT-PCR产物电泳图。A: 对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β +益肝康组; D: IL-1 β +丹参小复方组; E: IL-1 β +丹参组; F: 丹参组; G: 丹参小复方组; H: 益肝康组。

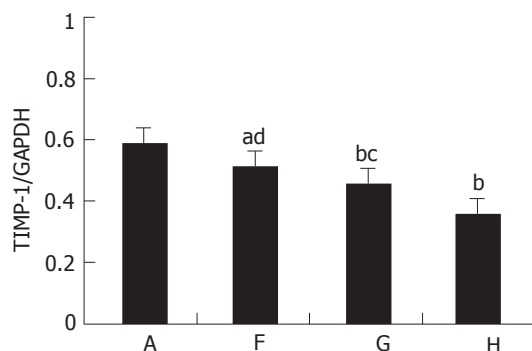


图4 益肝康等活血化瘀中药对HSC TIMP-1 mRNA的影响。A: 对照组; F: 丹参组; G: 丹参小复方组; H: 益肝康组。^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs A组, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs H组。

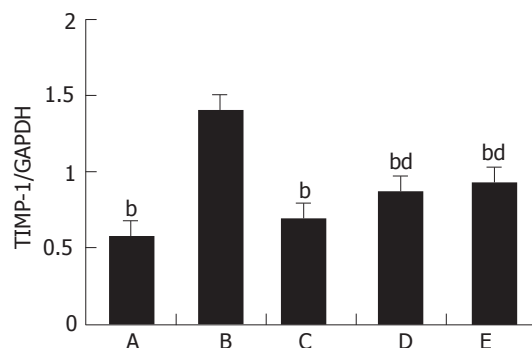


图5 益肝康等活血化瘀中药对IL-1 β 刺激的HSC TIMP-1 mRNA表达的影响。A: 对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β +益肝康组; D: IL-1 β +丹参小复方组; E: IL-1 β +丹参组。^b $P<0.01$ vs B组, ^d $P<0.01$ vs C组。

2.2 半定量RT-PCR检测TIMP-1 mRNA表达
TIMP-1 mRNA表达A组TIMP-1/GAPDH(0.591 ± 0.064)高于F组(0.493 ± 0.088 , $P<0.05$)、G组(0.458 ± 0.076 , $P<0.01$)、H组(0.356 ± 0.046 , $P<0.01$); H组低于F组($P<0.01$)和G组($P<0.05$); F组和G组相比差异无显著性($P>0.05$)(图3, 4)。证明益肝康等活血化瘀中药可以抑制HSC表达TIMP-1, 益肝康的作用强于丹参单药和丹参小复方。B组(1.369 ± 0.097)明显高于A组

(0.591 ± 0.064 , $P<0.01$)、C组(0.694 ± 0.078 , $P<0.01$)、D组(0.854 ± 0.05 , $P<0.01$)、E组(0.898 ± 0.12 , $P<0.01$); C组明显低于D组($P<0.01$)和E组($P<0.01$); D组和E组相比无显著性差异($P>0.05$)(图5)。证实了促进HSC表达TIMP-1 mRNA为IL-1 β 促进肝纤维化的发展的机制之一, 益肝康等活血化瘀中药可通过抑制IL-1 β 的这一作用来发挥其抗肝纤维化作用, 并且组方益肝康的作用明显强于丹参和丹参小复方。

3 讨论

激活的HSC是合成I、III型胶原、非胶原蛋白、蛋白多糖等ECM的主要细胞来源, 在肝纤维化的发生发展中起关键性作用^[8]。HSC的激活受多种细胞因子的调控, 如转化生长因子(TGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、血小板衍生生长因子(PDGF)等, HSCs又可分泌这些细胞因子并通过正反馈途径维持其活化状态。IL-1主要通过刺激肝脏炎症反应的产生而启动和加速肝纤维化的发展, 其机制主要是促进HSC活化和增生, 抑制ECM降解。MMP对ECM有广泛的降解作用, 是调节ECM动态平衡的最重要的一大酶系。现已发现20多种MMP, 间质性胶原酶主要包括MMP-1、MMP-8和MMP-13, 主要降解I、II、III型胶原; 明胶酶(MMP-2、MMP-9)主要降解基底膜重要成分天然IV型胶原、明胶和V型胶原等。肝纤维化形成过程中, 胶原沉积以间质胶原I、III型胶原为主, 降解此类胶原的酶在人类主要是MMP-1, 而鼠类主要是MMP-13。TIMPs为MMPs特异性抑制因子, 可与MMPs结合, 以1:1的比例形成MMPs-TIMP复合体, 从而阻断MMPs与底物结合, 是一种转录后调节机制。许多生长因子和细胞因子可以改变MMPs及TIMP的基因转录, 从而影响肝纤维化进程。重要者有IL-1 β 、表皮生长因子、PDGF、TNF α 等。王爱民 *et al*^[9]研究发现IL-1 β 可同时增强大鼠HSC的MMP-3、MMP-13、TIMP-1基因表达。本试验从IL-1 β 对HSCs增殖和TIMP-1基因表达这两个环节进行研究, 结果IL-1 β 组(B组)与对照组(A组)相比, B组HSCs增殖($P<0.01$)和TIMP-1 mRNA表达($P<0.01$)较A组明显增强(图2, 3, 5), 证实了IL-1 β 可明显促进大鼠HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达, 即为其促肝纤维化的重要机制。

随着肝纤维化的发生机制逐渐阐明, 肝纤维化治疗成为可能。目前尚乏理想的抗纤维化

西药. 秋水仙碱、D-青霉胺、己酮可可碱等药疗效差、毒副作用大, 大多限于实验阶段^[1,10-12]. 以活血化瘀为主中医中药治疗慢性肝炎、肝纤维化疗效显著, 且乏毒性, 显示出良好趋势, 已为国内外所共识^[13-23]. 随着对肝纤维化机制的深入了解, 对中药抗肝纤维化机制进一步阐明^[19-21]. 多靶点、多环节、多途径的综合作用是丹参等活血化瘀中药复方抗肝纤维化的特点^[22-24]. 中药复方“益肝康”为根据中医基础理论和几十年临床经验精心研制的以丹参为主的治疗慢性肝病、肝纤维化的有效方剂, 具有明显抗肝纤维化作用^[25-27]. 我所研究已证实“益肝康”不仅有抑制HSC活化、增殖及促HSC凋亡的作用, 还可通过抑制PDGF、TGF等促纤维化细胞因子的表达、抗脂质过氧化、促进胶原降解等作用发挥其抗肝纤维化功效^[8,18,25-31]. 我们关注影响肝纤维化的另一重要因素——MMP/TIMP酶系, 观察益肝康等活血化瘀中药对大鼠HSCs增殖及TIMP-1 mRNA表达的影响以及其对外源性IL-1 β 刺激的大鼠HSC的影响. 结果表明对HSCs应用活血化瘀中药丹参(F组)、丹参小复方(G组)、益肝康(H组)后HSC增殖均低于对照组(A组)($P<0.01$)(图1), TIMP-1 mRNA表达也低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图4), 说明益肝康等活血化瘀中药通过抑制HSCs增殖和TIMP-1表达发挥抗肝纤维化作用, 为了进一步探讨其与IL-1 β 这一促肝纤维化因素的关系, 我们又研究了对IL-1 β 预刺激的HSCs(B组)应用益肝康(C组)、丹参小复方(D组)、丹参(E组)药物干预, 结果显示C组、D组、E组HSCs增殖均明显低于B组($P<0.01$), TIMP-1 mRNA表达也明显低于B组($P<0.01$), 说明益肝康等活血化瘀中药能有效抑制外源性IL-1 β 刺激的HSCs增殖和TIMP-1表达. 以上研究表明, 益肝康等活血化瘀中药具有强大的抗肝纤维化功效, 其重要机制是抑制HSCs增殖和TIMP-1 mRNA的表达. 在肝纤维化患者中, 血清IL-1 β 水平随着肝纤维化程度的加重及肝组织病理纤维化分期严重程度而显著增加, 我们可以推测, 活血化瘀中药可能通过抑制IL-1 β 的作用发挥其抗肝纤维化疗效, 有待进一步研究. 值得注意的是以上数据显示丹参、丹参小复方、益肝康的抗纤维化作用强弱亦有明显差别, 益肝康抑制HSCs增殖及TIMP-1 mRNA表达的作用均明显强于丹参($P<0.05$)和丹参小复方($P<0.05$), 丹参与丹参小复方二者作用并无显

著差异($P>0.05$). 说明以丹参为主的活血化瘀中药组方-益肝康的抗肝纤维化作用强于丹参单药和丹参小复方, 符合中医基础理论君臣佐使合理配药这一精髓. 多年的临床应用也证实了益肝康的强有力的抗肝纤维化功效^[32], 其机制的逐渐阐明, 为我国抗肝纤维化药物的研制开发提供了理论基础, 为进一步提高抗肝纤维化药物疗效打下基础.

4 参考文献

- 1 姚希贤, 徐克成主编. 肝纤维化的基础与临床. 第一版, 上海: 上海科技教育出版社, 2003: 9-21
- 2 Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, Yasui T, Hasegawa K. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine* 2005; 29: 159-168
- 3 Han YP, Zhou L, Wang J, Xiong S, Garner WL, French SW, Tsukamoto H. Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen. *J Biol Chem* 2004; 279: 4820-4828
- 4 Yao XX, Jiang SL, Yao DM. Current research of hepatic cirrhosis in China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 617-622
- 5 王全楚, 申德林, 张成道, 许丽芝, 聂青和, 谢玉梅, 周永兴. 中药软肝缩脾丸对肝纤维化大鼠TIMP-1/2蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 379-382
- 6 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 511-514
- 7 Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 731-740
- 8 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 9 王爱民, 王宝恩, 杨跃伟, 赵一川, 韩涛, 杜双存. 白介素-1 β 对肝星状细胞基质分解素-1及其抑制因子基因表达的调节. *解放军医学杂志* 2000; 25: 374-375
- 10 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 363-369
- 11 Szalay F. Treatment of primary biliary cirrhosis. *J Physiol Paris* 2001; 95: 407-412
- 12 Wasser S, Lim GY, Ong CN, Tan CE. Anti-oxidant ebselen causes the resolution of experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1244-1253
- 13 郑旭锐, 孔莹, 孙守才, 胡建军, 靳光荣. 中药复方防治肝纤维化现代研究思路和策略. *陕西中医学院学报* 2005; 28: 29-30
- 14 薛冬英, 徐列明, 洪嘉禾. 浅谈中药复方在抗肝纤维化中的作用. *中国中医药信息杂志* 2003; 10: 34-35
- 15 姚欣, 姚希贤, 修贺明, 高君萍, 张玉琢. 活血化瘀中药益肝浓缩煎剂对大鼠肝纤维化的作用. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 544-548
- 16 孙玉凤, 姚希贤, 蒋树林. 肝纤维化的中医中药治疗.

■名词解释

君臣佐使: 为中医基础理论中中药合理配伍的原则. 简单讲就是中药组方讲究根据药性药效配合, 这样就会达到单味药所不及的特殊功效, 以发挥中药的强大的疗效. 提示我们不能把某一种中药等同于某一种西药的作用, 否则就容易走入中医“废医存药”的误区.

■同行评价

本文对临床肝纤维化治疗有一定的参考意义,为抗肝纤维化药物的研制开发提供了理论基础,有较强的科学性、创新性。

- 世界华人消化杂志 2000; 8: 686-687
- 17 梁萍, 薄爱华, 薛贵平, 韩瑞, 李海峰, 许永利. 苦参碱抗免疫性肝损伤机制的研究. 世界华人消化杂志 1999; 7: 104-108
- 18 姚希贤, 唐有为, 姚冬梅, 修贺明. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠 I, III 型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001; 9: 263-267
- 19 Gressner AM. The up-and-down of hepatic stellate cells in tissue injury: apoptosis restores cellular homeostasis. *Gastroenterology* 2001; 120: 1285-1288
- 20 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416
- 21 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 315-334
- 22 王伟, 杨肃文, 张立煌. 中药抗肝纤维化的细胞和分子机理研究进展. 中华实用中西医杂志 2004; 4: 813-815
- 23 凌云彪, 许瑞云, 邱万寿, 褚中华, 杨宏志, 谈智, 区庆嘉. 大鼠含抗肝纤维化中药的血清对肝星状细胞的作用. 中国病理生理杂志 2003; 19: 1649-1652
- 24 张文胜, 程明亮, 陆荫英. 中药复方对肝纤维化大鼠细胞因子的影响. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 285-287
- 25 姚希贤, 姚欣, 修贺明, 宋梅, 冯丽英. “益肝浓缩煎剂”等活血化瘀药抗大鼠肝纤维化作用实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2001; 10: 217-219
- 26 孙玉凤, 姚希贤, 崔东来. 益肝浓缩煎剂抗肝纤维化的实验研究. 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 84-86
- 27 蒋树林, 李校天, 姚希贤. 益肝康对大鼠肝纤维化的防治作用. 中国全科医学 2002; 5: 525-527
- 28 房红梅, 姚冬梅, 姚希贤, 王天秩. 益肝康的药物血清对大鼠HSCs增殖及PD GF基因表达的影响. 第三军医大学学报 2004; 26: 611-612
- 29 Majima T, Lo IK, Randle JA, Marchuk LL, Shrive NG, Frank CB, Hart DA. ACL transection influences mRNA levels for collagen type I and TNF-alpha in MCL scar. *J Orthop Res* 2002; 20: 520-525
- 30 Kossi J, Aalto J, Haataja S, Niinikoski J, Peltonen J, Laato M. The effects of sialic acid on the gene expression of fibrillar collagens: different changes in normal and fibrotic scar derived fibroblasts. *Ann Chir Gynaecol* 2001; 90: 25-28
- 31 Garcia-Ruiz I, de la Torre P, Diaz T, Esteban E, Fernandez I, Munoz-Yague T, Solis-Herruzo JA. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 30551-30558
- 32 姚洪森, 张健, 姚希贤. “益肝康”治疗90例慢性乙型肝炎肝纤维化疗效观察. 武警医学 2004; 15: 30-33

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

第一届全国临床营养支持学术会议通知

经中华医学会外科学分会批准,“第十届全国临床营养支持学术会议”将于2006-05在上海召开。本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办,主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结。现将征文要求通知如下:

1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号,上海中山医院外科吴国豪收,邮编:200032;同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn,注明上海中山医院外科吴国豪收。征文请自留底稿,恕不退稿。

2 截稿日期

征文截止日期:2006-03-15。

本次会议举行优秀论文评奖活动,欢迎踊跃投稿。会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分。

全反式维甲酸对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏 TGF- β 1、CTGF 和 Col1a1 表达的影响

付 好, 但自力, 唐望先, 晏 维, 潘志红, 熊章鄂

付好, 但自力, 潘志红, 熊章鄂, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
唐望先, 晏维, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
付好, 女, 1980-08-28生, 湖北省武汉人, 汉族, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科硕士, 主要研究分子肝脏病学的基础与临床。
通讯作者: 但自力, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. danzili@msn.com
电话: 027-83663611
收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-11-24

Effect of all-trans retinoic acid on expression of TGF- β 1, CTGF and Col1a1 in chronic alcoholic liver disease in rats

Yu Fu, Zi-Li Dan, Wang-Xian Tang, Wei Yan, Zhi-Hong Pan, Zhang-E Xiong

Yu Fu, Zi-Li Dan, Zhi-Hong Pan, Zhang-E Xiong, Department of Digestology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Wang-Xian Tang, Wei Yan, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Zi-Li Dan, Department of Digestology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. danzili@msn.com
Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To investigate the role of all-trans retinoic acid (ATRA) in the early stage of alcoholic liver fibrosis in rats, by observing its effect on the expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), connective tissue growth factor (CTGF) and pro alpha 1 (I) collagen (Col1a1).

METHODS: Twenty-four rats were randomly and averagely divided into three groups, named J, A, and N. The rats in group J was given the mixture of ethanol and corn oil, and those in group A were added ATRA [0.15 mg/(kg·d)] after treatment with the same mixture for 8 wk. The animals in group N served as the controls, treating with the same amount of normal saline

plus corn oil. All the mixtures were given intragastrically. All the animals were killed after 16 weeks. The histological changes of liver tissues were observed under light and electron microscope. The concentration of hepatic retinoic acid was examined using high-performance liquid chromatography (HPLC). The expression of TGF- β 1, CTGF and Col1a1 mRNA were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expression of TGF- β 1 and CTGF were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Ethanol intake led to alcoholic hepatitis. The swelling mitochondria and expanding endoplasmic reticulum were observed under electron microscope in the rats of group J. The damage was partially alleviated in group A. The concentration of hepatic retinoic acid was significantly decreased in group J than that in group N and A (76.7 ± 29.1 pmol/g vs 182.6 ± 37.2 , 182.8 ± 273.8 pmol/g, $P < 0.05$), while it was not markedly different between group A and N. The expression of Col1a1 mRNA was 0.10 ± 0.02 , 0.18 ± 0.03 , and 0.14 ± 0.03 in group N, J and A, respectively, and significant difference existed between either two groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Ethanol treatment elevated the protein and mRNA expression of TGF- β 1 (gray level: 105.9 ± 10.1 vs 149.3 ± 10.2 , $P < 0.01$; mRNA: 0.53 ± 0.17 vs 0.34 ± 0.05 , $P < 0.01$) and CTGF (gray level: 130.8 ± 5.7 vs 158.4 ± 6.6 , $P < 0.05$; mRNA: 0.41 ± 0.13 vs 0.17 ± 0.05 , $P < 0.05$) markedly, but up-regulated expression were decreased after ATRA treatment (TGF- β 1 gray level: 130.8 ± 6.2 , mRNA: 0.41 ± 0.06 ; CTGF gray level: 149.2 ± 6.6 , mRNA: 0.30 ± 0.04) ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Small amount of ATRA can interfere the development of the ethanol-induced liver fibrosis in the early stage through suppressing the expression of TGF- β 1, CTGF and Col1a1.

Key Words: Alcoholic liver disease; All-trans retinoic acid; Transforming growth factor β 1; Connective tissue growth factor; Pro alpha 1 (I) collagen

■背景资料

类维生素A与肝纤维化的关系一直是人们关心的课题。HSC是VitA的主要储存细胞, 人体大约90%的VitA储存在HSC中。当HSC活化时, VitA含量明显减少, 因此我们猜测VitA含量与HSC的激活存在关联。现在国外实验也证明小剂量VitA具有抗纤维化作用, 而大剂量则有促纤维化作用。VitA主要通过其代谢产物全反式维甲酸和其同分异构体9-顺式维甲酸及核内受体RAR/RXR起作用, 从而影响HSC的生理活动。因此我们用维甲酸体外干预酒精性肝损伤观察他对肝纤维化早期的影响, 以了解维甲酸用于治疗肝纤维化的前景。

■同行评价

本文目的和创新点明确,方法规范,统计学结果可信,有一定学术价值。

Fu Y, Dan ZL, Tang WX, Yan W, Pan ZH, Xiong ZE. Effect of all-trans retinoic acid on expression of TGF- β 1, CTGF and Col1a1 in chronic alcoholic liver disease in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):179-183

慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏TGF- β 1、CTGF和Col1a1表达的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(2):179-183

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/179.asp>

摘要

目的: 通过观察全反式维甲酸对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏TGF- β 1、CTGF和Col1a1表达的影响,探讨该药物对酒精性肝纤维化形成的作用。

方法: 大鼠24只随机分为3组:酒精组(J组),给予酒精-玉米油混悬液灌胃;治疗组(A组),给予上述混悬液灌胃8 wk后加用0.15 mg/(kg·d)的全反式维甲酸灌胃;对照组(N组),给予等量的生理盐水和玉米油灌胃。16 wk后处死大鼠。光、电镜下观察肝组织病理改变,高压液相色谱法(HPLC)测肝组织中维甲酸的含量,免疫组化法检测肝组织中转化生长因子 β 1(TGF- β 1)和结缔组织生长因子(CTGF)的蛋白水平,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝组织中TGF- β 1、CTGF和I型胶原前胶原 α_1 (Col1a1)的mRNA水平。

结果: 光镜下酒精组及治疗组均呈不同程度的酒精性肝炎改变,电镜下酒精组肝细胞线粒体肿胀,内质网扩张,脱颗粒,而治疗组改变轻于酒精组。肝组织中维甲酸含量:酒精组低于正常组,治疗组接近对照组水平。Col1a1的mRNA表达在酒精组中较对照组明显增高(0.18 ± 0.03 vs 0.10 ± 0.02 , $P < 0.01$),治疗组较酒精组表达下降(0.14 ± 0.03 vs 0.18 ± 0.03 , $P < 0.05$)。TGF- β 1的mRNA及蛋白表达在酒精组中增高(0.53 ± 0.17 vs 0.34 ± 0.05 , 105.93 ± 10.12 vs 149.27 ± 10.17 , $P < 0.01$),治疗组相对于酒精组有所下降(0.41 ± 0.06 vs 0.53 ± 0.17 , 130.80 ± 6.23 vs 105.93 ± 10.12 , $P < 0.05$)。CTGF的mRNA及蛋白表达在酒精组中增高(0.41 ± 0.13 vs 0.17 ± 0.05 , 130.84 ± 5.72 vs 158.37 ± 6.64 , $P < 0.05$),治疗组对于酒精组有所下降(0.30 ± 0.04 vs 0.41 ± 0.13 , 149.23 ± 6.65 vs 130.84 ± 5.72 , $P < 0.05$)。

结论: 小剂量全反式维甲酸通过降低慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏致纤维化因子TGF- β 1、CTGF和Col1a1的表达抑制早期酒精性肝纤维化的形成。

关键词: 酒精性肝病;全反式维甲酸;转化生长因子 β 1;结缔组织生长因子;I型胶原前胶原 α_1 基因

付妤, 但自力, 唐望先, 晏维, 潘志红, 熊章鄂. 全反式维甲酸对

0 引言

长期过量的酒精摄入会导致不同程度的肝损伤并逐步向肝纤维化、肝硬化发展。在肝损伤早期可观察到肝组织中维甲酸含量下降^[1-3]。维甲酸含量的降低可影响肝星状细胞的激活^[4],从而影响TGF- β 等一系列致纤维化因子的释放^[5]。目前,对维甲酸在酒精性肝病中的作用研究的结果不一。我们通过补充小剂量维甲酸,观察其对慢性酒精性肝损伤中TGF- β 1、CTGF和Col1a1的影响,以探讨维甲酸在酒精性肝纤维化形成早期的作用及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar δ 大鼠(清洁级)24只,体质量180-200 g,购自同济医学院实验动物中心。无水乙醇(上海振兴化工一厂)。金龙鱼牌玉米油(南海油脂公司)。维甲酸原药(山东良福制药有限公司)。美国产Waters 2690高效液相色谱仪及996-二极管阵列检测器,Millennium 3.20色谱软件。色谱柱: Eurospher C18反相色谱柱(德国KNAUER公司)。抗大鼠TGF- β 1和CTGF多克隆抗体(武汉博士德生物制品公司),SP免疫组化试剂盒(武汉凌飞试剂公司),ECL发光试剂(武汉众一试剂公司),M-MLV逆转录酶(Promega公司),TaqDNA聚合酶(北京鼎国公司)。引物均由上海生工合成。

1.2 方法 大鼠正常喂养1 wk后随机分为3组:对照组(N组)、酒精组(J组)、治疗组(A组),每组8只。生理盐水和无水乙醇配成500 mL/L乙醇。J组给予7 g/(kg·d)酒精及2 g/(kg·d)玉米油混悬液每日1次灌胃。A组以同样的方法灌胃8 wk后,再将0.15 mg/(kg·d)的维甲酸溶于酒精-玉米油混悬液中灌胃。N组给予等量的玉米油和生理盐水灌胃。实验期间正常饮食饮水,16 wk末处死大鼠。肝组织部分液氮速冻后-80℃贮存,部分投入100 g/L中性甲醛固定,石蜡包埋,常规HE染色。另40 g/L戊二醛固定标本,树脂包埋,透射电镜观察。

1.2.1 HPLC测肝组织中维甲酸含量 方法参照Wang *et al*^[2]。取0.3 g肝组织在体积比为2:1的冰HEPES:甲醇混合液中匀浆,取1 mL匀浆液加入内标视黄醇醋酸酯后用正己烷抽提2次, N₂

吹干, 溶于无水乙醇中进样. 反向梯度HPLC的流动相为甲醇: 水(体积比70: 30, 水中含10 g/L醋酸铵, 溶剂A)和甲醇(溶剂B). 梯度过程如下(流速1 mL/min): 1 000 mL/L溶剂A冲洗8 min后10 min线性梯度至300 mL/L溶剂A和700 mL/L溶剂B, 20 min的线性梯度至1 000 mL/L溶剂B, 并保持20 min, 再以2 min的线性梯度至1 000 mL/L溶剂A. 检测波长340 nm. 维甲酸的量通过内标的峰面积进行半定量.

1.2.2 免疫组织化学检测TGF- β 1和CTGF蛋白 采用免疫组织化学SP法, 操作步骤按试剂盒说明. TGF- β 1、CTGF抗体稀释度均为1: 200, 用PBS代替一抗作阴性对照. 采用Mias-2000图像分析系统分析结果: 每张切片任意选取10个区域, 在200倍物镜下测定阳性物质平均灰度值.

1.2.3 RT-PCR检测TGF- β 1、CTGF和Col1a1 mRNA 采用半定量RT-PCR法检测, 以 β -actin为内参照. 总RNA提取: 取50-100 mg肝组织剪碎后加Trizol于匀浆器中匀浆, 再用氯仿抽提, 异丙醇、乙醇沉淀, 最后溶于焦碳酸二乙酯处理过的水中. 取2 μ g RNA进行逆转录, 步骤参照逆转录酶所附说明进行. 大鼠Col1a1的引物序列: 上游5' GTCCTATGGCTATGATGAGAAATC 3', 下游5' CACCATCCAAACCACTGAAAC 3' (335 bp); 大鼠TGF- β 1的引物序列: 上游5' CCG-CAACAACGCAATCTATG 3', 下游5' GCCCTGTATTCCGTCTCCTT 3' (304 bp); 大鼠CTGF的引物序列: 上游5' CGGGAAATGCTGTGAG-GAGT 3', 下游5' CAGGCTTGGCAATTTTAG-GC 3' (326 bp); 大鼠 β -actin的引物序列: 上游5' TGTGCTATGTTGCCCTAGACT 3', 下游5' TCGTACTCCTGCTTGCTGAT 3' (442 bp). PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后用GDS-8000型凝胶成像系统照像并用自带的图像分析系统计算基因相对表达值. 目的基因相对表达值 = (目的基因条带灰度值) / (β -actin基因条带灰度值).

统计学处理 数据经SPSS 12.0软件处理, 采用 t 检验进行统计分析, 用mean \pm SD表示, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著差异的检验标准.

2 结果

试验过程中共有4只大鼠死亡, J组、A组各死亡2只. 其中2只死于误灌, 1只死于胃大出血, 1只死于胃扩张.

2.1 肝脏病理学改变 HE染色示J组肝组织切片

表 1 肝组织维甲酸含量, TGF- β 1和CTGF蛋白水平 (mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	维甲酸含量 (pmol/g)	TGF- β 1 (灰度值)	CTGF (灰度值)
对照组 (N)	8	182.6 \pm 37.2	149.3 \pm 10.2	158.4 \pm 6.6
酒精组 (J)	6	76.7 \pm 29.1 ^a	105.9 \pm 10.1 ^b	130.8 \pm 5.7 ^a
治疗组 (A)	6	182.8 \pm 273.8 ^c	130.8 \pm 6.2 ^c	149.2 \pm 6.6 ^c

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 酒精组.

呈大、小泡性脂肪变, 以大泡性为主. 病变在中央静脉周围及肝包膜下更为明显, 伴有点、灶状坏死, 炎性细胞浸润. A组中脂肪变、坏死及炎性改变较J组减轻. N组无上述改变. 电镜下J组细胞肿胀较明显, 胞质内线粒体轻度肿胀, 基质密度增高, 嵴模糊不清. 粗面内质网数量减少, 扩张, 大部分多聚核蛋白体从粗面内质网上脱落(脱颗粒). 滑面内质网扩张成囊状. 另可见少量肝细胞坏死, 细胞膜破裂, 肿胀的细胞器游离于细胞核周围, 核不规则改变, 染色质凝集. 胞质内可见散在分布的脂滴. A组肝细胞轻度肿胀, 线粒体基质密度稍增高, 嵴模糊不清. 粗面内质网数量无明显改变, 轻度扩张, 无明显脱颗粒现象. 滑面内质网轻度扩张. N组超微结构均正常.

2.2 肝组织中维甲酸的含量 J组与N组比较维甲酸含量明显下降($P < 0.05$). A组维甲酸含量接近N组水平($P > 0.05$)(表1).

2.3 TGF- β 1和CTGF的蛋白表达 TGF β 1在N组中仅少量表达于肝组织的间质细胞内, 在J组中表达增多, 分布于窦周细胞、炎性细胞、脂肪变性肝细胞胞膜及少数肝细胞胞质, 以肝小叶中央静脉和汇管区更为明显. CTGF在N组无表达或仅在汇管区基质及间质细胞胞质内有少量表达. 在J组中于窦周细胞、炎性细胞以及少数肝细胞也可见表达, 主要见于在胞质内, 胞膜上也有少量表达. 两种蛋白在A组中表达较J组减少(表1).

2.4 TGF- β 1、CTGF和Col1a1的mRNA表达 J组中TGF- β 1、CTGF和Col1a1表达明显高于N组, 而A组中表达较J组减少($P < 0.05$)(图1A, B, C, 表2).

3 讨论

慢性过量的酒精摄入会导致肝组织中维甲酸含量的下降, 其可能的机制有: (1)维甲酸合成减少 肝组织中的维甲酸主要由VitA转化而来, 而乙醇与VitA的转化具有相似的通路, 都要经过乙醇脱氢酶代谢为相应的醛类, 因此乙醇可通过与VitA

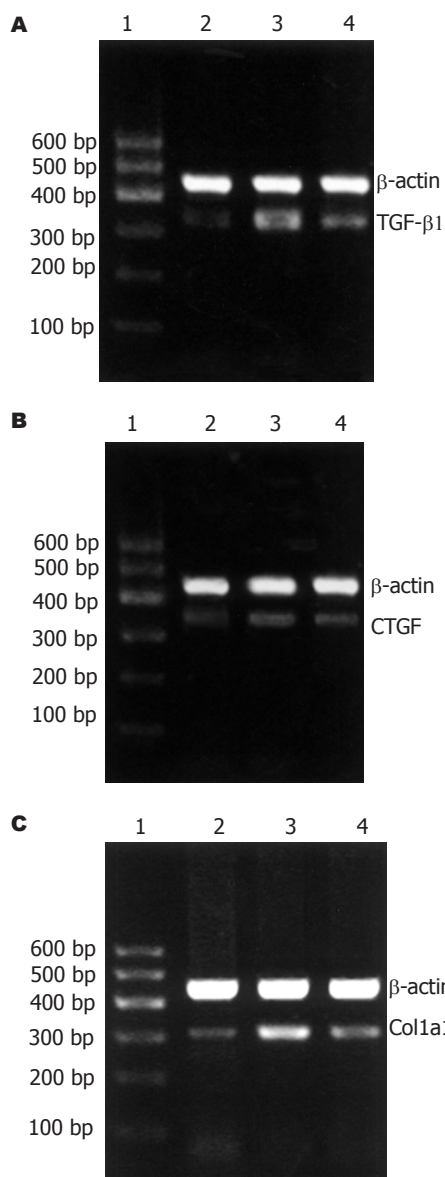


图1 大鼠肝组织TGF- β 1, CTGF和Col1a1 mRNA的表达(RT-PCR). 1: Marker; 2: N组; 3: J组; 4: A组. A: TGF- β mRNA; B: CTGF mRNA; C: Col1a1 mRNA.

竞争性利用乙醇脱氢酶来抑制VitA向维甲酸的转化^[6]. 同时乙醇还可促进VitA向肝外组织的转移, 从而减少维甲酸的合成^[7]; (2)维甲酸代谢增加 细胞色素P4502E1可催化维甲酸代谢为极性产物, 而慢性的乙醇摄入可诱导细胞色素P450的合成, 加快维甲酸的代谢^[8,9]. 维甲酸具有类似甲状腺素的作用机制, 可通过细胞核内DNA结合蛋白调节有关基因的表达从而发挥一系列生物效应^[10]. Davis *et al*^[11]发现维甲酸可抑制星状细胞的活化, 调节TGF- β 1的产生. 目前, 国外对维甲酸在肝纤维化中的作用的研究结论不一. 有人发现维甲酸或其类似物可加重纤维化^[12,13], 也有人发现他们可减轻肝纤维化^[11,14]. 其原因可能

表2 肝组织TGF- β 1, CTGF和Col1a1 mRNA表达的水平(mean \pm SD)

分组	n	TGF- β 1	CTGF	Col1a1
对照组(N)	8	0.34 \pm 0.05	0.17 \pm 0.05	0.10 \pm 0.02
酒精组(J)	6	0.53 \pm 0.17 ^b	0.41 \pm 0.13 ^a	0.18 \pm 0.03 ^b
治疗组(A)	6	0.41 \pm 0.06 ^c	0.30 \pm 0.04 ^c	0.14 \pm 0.03 ^c

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 酒精组.

与维甲酸种类、剂量不同以及模型和实验方法的不一致有关. 我们通过观察小剂量维甲酸对酒精性肝损伤大鼠肝脏中促纤维化因子的影响, 发现小剂量维甲酸具有抑制早期纤维化因子表达的作用. 其机制可能为维甲酸抑制TGF- β 1表达从而减少CTGF及Col1a1的表达来发挥其抑制纤维化作用. 维甲酸受体RAR α 、RXR α 与激活蛋白-1(AP-1)有相互拮抗作用^[15,16], 增加维甲酸及其受体的含量可减少AP-1驱动TGF- β 1的产生^[17]. CTGF属即刻早期基因, 在CTGF基因启动子序列中存在TGF- β 的顺式调控元件(TGF- β RE), 位于启动序列-168 bp和-128 bp之间^[18]. 机体损伤和纤维化发生时CTGF高表达并作为TGF- β 的下游介质介导细胞外基质的生成^[19]. Col1a1是I型胶原 α 1链的编码基因, 其mRNA的转录亦受TGF- β 的调控^[20,21]. 维甲酸可能通过减少TGF- β 1的表达来影响其介导的纤维化生成.

我们仅研究了小剂量维甲酸对酒精性肝损伤及肝纤维化的影响, 而不同剂量维甲酸对不同原因所致肝损伤及纤维化的作用还有待进一步研究.

致谢: 华中科技大学附属同济医院病理科吴翠环教授对本实验病理学方面提供的支持, 山东良福制药有限公司提供维甲酸原药.

4 参考文献

- Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 3-15
- Wang XD, Liu C, Chung J, Stickel F, Seitz HK, Russell RM. Chronic alcohol intake reduces retinoic acid concentration and enhances AP-1 (c-Jun and c-Fos) expression in rat liver. *Hepatology* 1998; 28: 744-750
- Wang XD. Chronic alcohol intake interferes with retinoid metabolism and signaling. *Nutr Rev* 1999; 57: 51-59
- Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002; 50: 891-896
- Li H, Zhang JS, Huang GC, Zhang N, Chen Q, Zhang XR. Effect of RAR-beta transfection on the proliferation and phenotype of rat hepatic stellate cells. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002; 10: 297-300
- Han CL, Liao CS, Wu CW, Hwong CL, Lee AR, Yin SJ. Contribution to first-pass metabolism of ethanol

- and inhibition by ethanol for retinol oxidation in human alcohol dehydrogenase family-implications for etiology of fetal alcohol syndrome and alcohol-related diseases. *Eur J Biochem* 1998; 254: 25-31
- 7 Mobarhan S, Seitz HK, Russell RM, Mehta R, Hupert J, Friedman H, Layden TJ, Meydani M, Langenberg P. Age-related effects of chronic ethanol intake on vitamin A status in Fisher 344 rats. *J Nutr* 1991; 121: 510-517
 - 8 Liu C, Russell RM, Seitz HK, Wang XD. Ethanol enhances retinoic acid metabolism into polar metabolites in rat liver via induction of cytochrome P4502E1. *Gastroenterology* 2001; 120: 179-189
 - 9 Wang XD. Alcohol, vitamin A, and cancer. *Alcohol* 2005; 35: 251-258
 - 10 Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of Retinoid Nuclear Receptors: Lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signalling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005
 - 11 Davis BH, Kramer RT, Davidson NO. Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen, and transforming growth factor beta production. *J Clin Invest* 1990; 86: 2062-2070
 - 12 Okuno M, Moriwaki H, Imai S, Muto Y, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells. *Hepatology* 1997; 26: 913-921
 - 13 Vollmar B, Heckmann C, Richter S, Menger MD. High, but not low, dietary retinoids aggravate manifestation of rat liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 791-799
 - 14 Hellemans K, Verbuyst P, Quartier E, Schuit F, Rombouts K, Chandraratna RA, Schuppan D, Geerts A. Differential modulation of rat hepatic stellate phenotype by natural and synthetic retinoids. *Hepatology* 2004; 39: 97-108
 - 15 Benkoussa M, Brand C, Delmotte MH, Formstecher P, Lefebvre P. Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4522-4534
 - 16 DiSepio D, Sutter M, Johnson AT, Chandraratna RA, Nagpal S. Identification of the AP1-antagonism domain of retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999; 1: 7-13
 - 17 Salbert G, Fanjul A, Piedrafita FJ, Lu XP, Kim SJ, Tran P, Pfahl M. Retinoic acid receptors and retinoid X receptor-alpha down-regulate the transforming growth factor-beta 1 promoter by antagonizing AP-1 activity. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1347-1356
 - 18 Grotendorst GR, Lau LF, Perbal B. CCN proteins are distinct from, and should not be considered members of, the insulin-like growth factor-binding protein superfamily. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 944-945
 - 19 Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, Buchler MW. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 2000; 20: 296-304
 - 20 Lindahl GE, Chambers RC, Papakrivopoulou J, Dawson SJ, Jacobsen MC, Bishop JE, Laurent GJ. Activation of fibroblast procollagen alpha 1(I) transcription by mechanical strain is transforming growth factor-beta-dependent and involves increased binding of CCAAT-binding factor (CBF/NF-Y) at the proximal promoter. *J Biol Chem* 2002; 277: 6153-6161
 - 21 Falanga V, Zhou L, Yufit T. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *J Cell Physiol* 2002; 191: 42-50

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

●消息●

加入台湾华艺 CEPS 中文电子期刊服务声明

本刊讯 世界华人消化杂志, 将自2005年7月起, 加入台湾中文电子期刊服务—思博网(CEPS)。中文电子期刊服务—思博网是目前台湾地区最大的期刊全文数据库, 其访问地址为: www.ceps.com.tw。自此, 读者可以通过这一网址检索世界华人消化杂志于1993年起各期的全文, 在一段时期后, 还可以回溯检索13年前历年的全文。

此外, 由于世界华人消化杂志被CEPS收录, 故凡向本刊投稿者, 均视为其文稿刊登后可供思博网(CEPS)收录、转载并上网发行; 其作者文章著作权使用费与稿酬一次付清, 本刊不再另付其他报酬。

(世界华人消化杂志 2005-01-18)

5-Aza-CdR 对人结肠癌 Lovo 细胞增殖凋亡及抑癌基因 RUNX3 表达的影响

倪志, 刘南植, 李林芳, 张庆, 李秀梅, 洪玮

■背景资料

RUNX3 是一种新发现的定位于 1p36.1 的抑癌基因, 他是 RUNT 基因家族成员之一。RUNT 家族是一组高度保守的基因序列, 他们在细胞的生长发育的过程中起着重要的作用。近来多项研究发现 RUNX3 与人类多种消化系统肿瘤发生有着密切的相关性。

倪志, 刘南植, 张庆, 李秀梅, 洪玮, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
李林芳, 河北医科大学药理教研室 河北省石家庄市 050017
倪志, 男, 1975-07-21 生, 浙江省镇海人, 汉族, 2003 年华中科技大学同济医学院硕士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病临床及基础研究。
通讯作者: 刘南植, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。hknizhi@163.com
电话: 027-83663612
收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-11-24

Effects of 5-Aza-CdR on cell proliferation and apoptosis in colonic cancer cell line Lovo and expression of tumor suppressor gene RUNX3

Zhi Ni, Nan-Zhi Liu, Lin-Fang Li, Qing Zhang, Xiu-Mei Li, Wei Hong

Zhi Ni, Nan-Zhi Liu, Qing Zhang, Xiu-Mei Li, Wei Hong, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Lin-Fang Li, Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China
Correspondence to: Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. hknizhi@163.com
Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To investigate the effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on the proliferation and apoptosis of Lovo cells and the expression of tumor suppressor gene RUNX3.

METHODS: Human colonic cancer cell line Lovo was treated with 5-Aza-CdR (0.4, 4, 40 $\mu\text{mol/L}$), a specific demethylating agent, for 3 d, and then cultured in RPMI 1640 medium for 5 d. The growth of Lovo cells was observed by MTT assay before and after 5-Aza-CdR treatment, respectively. The expression of RUNX3 mRNA was observed by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The apoptosis of Lovo cells was analyzed by flow cytometry.

RESULTS: Lovo cells treated with 5-Aza-CdR displayed a slowed growth in comparison with the control cells, and the growth rate decreased accordingly with the increase of 5-Aza-CdR concentration. RUNX3 mRNA was expressed in Lovo cells after 5-Aza-CdR treatment, but it was undetectable before the treatment. After 0.4, 4, and 40 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR treatment, the level of RUNX3 mRNA expression was 0.46 ± 0.06 , 0.71 ± 0.06 , and 0.84 ± 0.07 , respectively, and it was significantly correlated with the concentration of 5-Aza-CdR ($F = 168.4$, $P < 0.01$). The apoptotic rate of Lovo cells treated with 0.4, 4, and 40 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR was $10.95\% \pm 2.09\%$, $17.61\% \pm 1.51\%$, and $26.60\% \pm 1.89\%$, respectively, which was markedly higher than that of the controls ($2.92\% \pm 0.93\%$) ($P < 0.01$). The apoptosis was also notably correlated with 5-Aza-CdR concentration ($F = 145.7$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: 5-Aza-CdR can inhibit the proliferation and partly induce the apoptosis of Lovo cells by inducing the re-expression of RUNX3 gene.

Key Words: RUNX3 gene; Methylation; 5-Aza-2'-deoxycytidine; Colonic cancer; Apoptosis

Ni Z, Liu NZ, Li LF, Zhang Q, Li XM, Hong W. Effects of 5-Aza-CdR on cell proliferation and apoptosis in colonic cancer cell line Lovo and expression of tumor suppressor gene RUNX3. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):184-188

摘要

目的: 研究抑癌基因 RUNX3 在人结肠癌细胞中的表达情况, 探讨 5-氮-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-CdR) 对人结肠癌 Lovo 细胞增殖凋亡及 RUNX3 表达的影响。

方法: 用特异性甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 0.4, 4, 40 $\mu\text{mol/L}$ 处理人结肠癌细胞株 Lovo 3 d, 继续常规培养 5 d 后, 采用四唑盐 (MTT) 比色观察细胞经药物处理前后的生长活性, 以半定量 RT-PCR 检测细胞处理前后抑癌基因 RUNX3 mRNA 的表达, 应用流式细胞仪进行

细胞凋亡率的检测。

结果:人结肠癌细胞Lovo经处理后,与对照组比较,5-Aza-CdR 0.4, 4, 40 $\mu\text{mol/L}$ 均能明显抑制肿瘤细胞生长,随5-Aza-CdR浓度增加,细胞生长速率下降;对照组Lovo细胞未见RUNX3 mRNA表达,经药物处理后的细胞均检出该种mRNA的重新表达,其mRNA的表达相对量分别为 0.46 ± 0.06 , 0.71 ± 0.06 , 0.84 ± 0.07 ,与药物存在剂量依赖性($F = 168.4$, $P < 0.01$);对照组细胞凋亡率为 $2.92\% \pm 0.93\%$,5-Aza-CdR 0.4, 4, 40 $\mu\text{mol/L}$ 处理后Lovo细胞凋亡率分别为 $10.95\% \pm 2.09\%$, $17.61\% \pm 1.51\%$, $26.60\% \pm 1.89\%$,与对照组相比较均有统计学意义($P < 0.01$),且凋亡率与5-Aza-CdR剂量呈正相关($F = 145.7$, $P < 0.01$)。

结论:在人结肠癌细胞株Lovo中,基因RUNX3可能因过甲基化而导致转录失活,RUNX3基因重新表达能抑制细胞生长,并能诱导部分细胞凋亡。

关键词: RUNX3基因; 甲基化; 5-氮-2'-脱氧胞苷; 结肠癌; 凋亡

倪志, 刘南植, 李林芳, 张庆, 李秀梅, 洪玮. 5-Aza-CdR对人结肠癌Lovo细胞增殖凋亡及抑癌基因RUNX3表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(2):184-188
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/184.asp>

0 引言

肿瘤的发生和发展过程中,抑癌基因的失活是关键因素之一.目前研究表明,抑癌基因失活的主要方式有基因的缺失、突变和启动子区域的过甲基化等^[1-4].5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)是一种DNA甲基转移酶的抑制剂,很多体外研究证实,5-Aza-CdR通过去甲基化作用能使多种CpG岛过甲基化的抑癌基因重新表达,而恢复抑癌功能^[5-8].RUNX3是一种新发现的抑癌基因,研究证实对胃癌细胞的生长具有明显的抑制作用,启动子区域CpG岛的过甲基化可能是其失活的方式^[4,9].结肠癌中该基因的表达研究尚少.我们采用5-Aza-CdR对结肠癌细胞株进行处理,检测RUNX3基因表达,并分析肿瘤细胞的生物学行为改变,以探讨肠癌的发生机制并寻求新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 小牛血清, RPMI 1640培养基(Gibco公

司); 5-Aza-CdR, MTT, DMSO, RNA酶A(RNase A)及碘化嘧啶(PI)(Sigma公司); RT-PCR试剂盒(大连宝生物公司); Trizol(MRC公司). 目的基因RUNX3及内参照GAPDH的引物均由Primer5.0软件自行设计,由上海生工公司合成,引物序列如下: RUNX3上游引物: 5'-CAGCCAAATCTTGCGACTC-3', 下游引物: 5'-ACCA GAAGGACTGCCTAACC-3', 产物片段长度852 bp; GAPDH上游引物: 5'-CCATGTTCGT CATGGGTGTGAACCA-3', 下游引物: 5'-GCCAGTAGAG GCAGGGATGATGTTC-3', 产物片段长度251 bp. 人结肠癌细胞株Lovo为华中科技大学同济医学院附属协和医院惠赠,用含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养基培养(37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度),隔日换液,细胞长满培养瓶壁80%-90%后,按1:2-1:4传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2 方法 将细胞以适宜密度接种,加入含5-Aza-CdR的RPMI 1640培养基,使其药物终浓度分别为0.4, 4, 40 $\mu\text{mol/L}$,每24 h更换为新鲜药液,浓度同前,连续作用3 d后弃去药液,以含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养基继续培养5 d.以未经药物干预的Lovo细胞作为对照组。

1.2.1 药物作用前后Lovo细胞增殖活性 上述经药物处理后的细胞及对照组细胞,以每孔 3×10^3 个细胞接种于96孔板,各组设5个复孔,共接种6板.待细胞6 h贴壁后,及其后每隔24 h取出1板,每孔加入浓度5 g/L的MTT 20 μL ,置培养箱内孵育4 h后,小心吸去培养液,加入150 μL DMSO, 37℃恒温水平摇床振摇15 min,待晶体充分溶解后,置全自动酶标仪于570 nm波长处读取吸光度(A),上述实验均重复3次.细胞增殖能力以平均吸光度(A)值分析,以A值为纵坐标,时间(d)为横坐标,绘制生长曲线。

1.2.2 用药后RUNX3 mRNA的表达 上述经药物处理后的细胞及对照组细胞,按Trizol试剂说明书一步法提取总RNA.通过紫外分光光度计检测RNA的260 nm与280 nm吸光度,计算出RNA浓度.1 μg RNA加入逆转录反应体系,以随机引物Random 9mers为引物进行逆转录反应,逆转录反应条件参照试剂盒说明.取2 μg 逆转录反应产物,按试剂盒说明书比例配成25 μL 的PCR反应体系.PCR反应条件: 94℃变性4 min, 1个循环; 94℃变性45 s, 57℃退火45 s, 72℃延伸45 s, 共35个循环;再以72℃延伸7 min.扩增产物于15 g/L琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统进行半

■创新盘点

国内未见结肠癌与RUNX3表达的相关性研究报道,本文初步探讨了RUNX3在结肠癌细胞Lovo中的表达情况及其可能失活机制,发现RUNX3可能因过甲基化而导致转录失活, RUNX3基因重新表达能抑制细胞生长,并能诱导部分细胞凋亡。

应用要点

RUNX3作为一个新发现的抑癌基因,在调控细胞的生长发育和细胞凋亡的过程中发挥着重要而复杂的转录调节作用。RUNX3可能成为一个消化系统恶性肿瘤的生物学标志和肿瘤基因治疗的靶点,为消化系统恶性肿瘤的诊治和治疗提供了一条新途径。

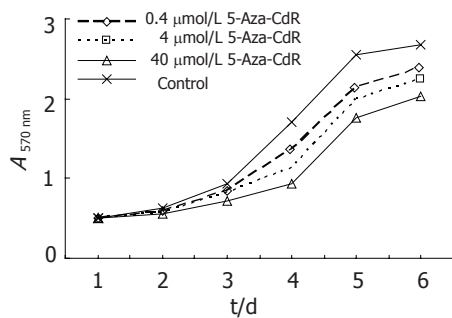


图1 Lovo细胞经5-Aza-CdR处理后的生长曲线。

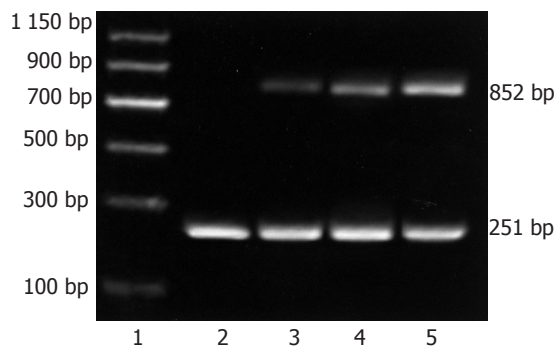


图2 5-Aza-CdR处理Lovo细胞后RUNX3 mRNA的表达。1: Marker; 2: 对照组; 3-5: 0.4, 4, 40 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR。

定量分析, RUNX3的相对表达水平 = RUNX3基因的RT-PCR产物电泳条带的密度/GAPDH基因的RT-PCR产物电泳条带的密度。

1.2.3 细胞凋亡的检测 上述经药物处理后的细胞及对照组细胞均以每孔 2×10^5 个接种于六孔板上,以含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养基培养4 d。按常规方法消化收集细胞,以PBS洗涤2次,以 -20°C 预冷的800 g/L乙醇固定,充分振摇均匀,置 -20°C 冰箱保存24 h以上。检测前离心(1500 r/min, 10 min),弃乙醇,以PBS洗涤2次,以PBS调节细胞密度至 $1 \times 10^9/\text{L}$,洗涤后加入由50 mmol/L磷酸钠和25 mmol/L枸橼酸按体积比9:1组成的PC缓冲液(pH 7.8)50 μL ,室温放置15 min,加PBS 0.5 mL, PI 50 μL (100 mg/L)和RNaseA 10 μL (5 mg/L)于室温、暗处放置染色30 min,以流式细胞仪(BD公司)进行细胞凋亡率检测。

统计学处理 实验数据用mean \pm SD表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,两组均数比较采用t检验,所有数据均由SPSS 12.0统计软件进行处理, $P < 0.05$ 为统计学上差异有显著性。

2 结果

2.1 Lovo细胞形态及生长速度

癌细胞Lovo,于5-Aza-CdR处理前为多角形,形态不规则;药物处理3 d后,可见细胞皱缩,多角形形态趋于规则。继续培养5 d后,可见细胞密度低,部分细胞体积缩小,死亡细胞数多。细胞经3种不同浓度5-Aza-CdR处理后,细胞的生长速度受到不同程度的抑制,随着药物浓度的增加抑制作用增强(图1)。

2.2 Lovo细胞RUNX3 mRNA的表达 RT-PCR检测对照组细胞未见RUNX3基因的mRNA表达,5-Aza-CdR处理后的细胞RUNX3基因的mRNA重新表达(图2),分别用浓度0.4, 4, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的5-Aza-CdR处理细胞后,细胞RUNX3 mRNA的相对表达量分别为 0.46 ± 0.06 , 0.71 ± 0.06 , 0.84 ± 0.07 ,且具有剂量依赖关系($F = 168.4$, $P < 0.01$)。

2.3 5-Aza-CdR对Lovo细胞凋亡率的影响 经流式细胞仪检测分析,对照组细胞凋亡率为 $2.92\% \pm 0.93\%$,经5-Aza-CdR 0.4, 4, 40 $\mu\text{mol/L}$ 处理后在细胞周期G1峰前出现明显的凋亡峰,细胞凋亡率逐渐增高,凋亡率分别为 $10.95\% \pm 2.09\%$, $17.61\% \pm 1.51\%$, $26.60\% \pm 1.89\%$,与对照组相比较有统计学意义($P < 0.01$),细胞凋亡率与5-Aza-CdR浓度水平具有剂量依赖关系($F = 145.7$, $P < 0.01$)。

3 讨论

结肠癌和其他肿瘤一样,其发生和发展是一个多基因、多步骤的过程,癌基因的激活和/或抑癌基因的失活是其分子学基础。肿瘤学研究表明,DNA甲基化在基因表达调控、细胞增殖、分化、发育及基因组印迹等方面起着重要的作用,并与肿瘤的发生发展关系密切^[10-12]。DNA的过甲基化是引起抑癌基因失活的重要方式。DNA过甲基化并不是基因序列发生改变,而只是部分碱基对发生甲基化修饰,这种异常的甲基化模式是可以逆转的^[13,14]。

RUNX3是一种新发现的定位于1p36.1的抑癌基因,广泛表达于消化道上皮细胞、间叶细胞、血液细胞及神经细胞等^[15-17]。RUNX3是RUNT基因家族的成员之一,RUNT基因家族是由RUNX1、RUNX2、RUNX3等三个成员组成,其编码蛋白是一组DNA结合转录因子,在细胞的生长、发育及凋亡过程中起着重要的作用^[18-21]。许多研究发现,RUNX3-/-的胃黏膜上皮细胞的过度增生和凋亡减少与细胞对TGF- β 诱导凋亡的敏感性降低有关,TGF- β 作为诱导抑制增生因子其诱导凋亡的作用在RUNX3-/-的胃黏

膜上皮细胞中完全失活, 结果提示, RUNX3可能是TGF- β 信号传导途径的关键作用靶点^[4,22]. 进一步研究证实, 在TGF- β 信号传导过程中, TGF- β 与被激活的Smad形成的复合物由胞质转入胞核内后需在RUNX3蛋白的指导下与核内特异性的靶点相结合, 并增强其结合力, 共同调节相关靶基因的转录. RUNX3表达沉默可导致TGF- β 信号途径紊乱, 引起TGF- β 信号失活, 进而引发细胞的凋亡障碍, 导致肿瘤的发生^[22-24].

本研究结果显示, 人结肠癌细胞株Lovo不表达RUNX3基因的mRNA, 而经过5-Aza-CdR处理后的细胞重新表达RUNX3的mRNA, 提示在结肠癌细胞中RUNX3表达失活可能是由于启动子区域的CpG岛过甲基化所致. 5-Aza-CdR是一种DNA甲基转移酶1(DNMT1)抑制剂, 他是一种脱氧胞苷类似物, 在DNA复制过程中与DNA分子相结合, 并与DNMT1形成一共价复合物, 抑制该酶的甲基转移活性, 生成低甲基化子链, 从而实现去甲基化功能^[25-27]. 我们发现, Lovo细胞经过5-Aza-CdR处理后, MTT检测的细胞生长曲线及流式细胞仪检测的细胞凋亡率可以看出细胞的增殖不同程度受到抑制, 细胞凋亡率明显提高. 上述结果提示, 5-Aza-CdR可能使因甲基化失活的RUNX3基因去甲基化而重新表达, 恢复其抑癌功能, 从而导致抑制结肠癌细胞生长并诱导其凋亡的作用. 当然, 若5-Aza-CdR本身存在细胞毒性也可以产生类似作用. 目前研究表明, 有细胞毒性作用的药物其细胞毒效应均存在着时效性, 而未发现抑制肿瘤细胞生长的可遗传性^[28]. 在本研究中, 实验所用均是药物作用后并继续培养5 d以上的细胞, 因而提示5-Aza-CdR抑制肿瘤细胞生长、诱导其凋亡并非其本身的药物毒性直接所致, 而是其去甲基化的间接作用. RUNX3的mRNA重新表达后, 随着mRNA表达增强, 结肠癌细胞生长明显减慢, 提示RUNX3可能直接或间接参与调控细胞DNA的复制合成.

RUNX3作为一种新发现的抑癌基因, 其表达可通过TGF- β 信号途径抑制细胞的过度增殖并诱导凋亡. RUNX3可能成为结肠癌的一个新的生物学标志和基因治疗的靶点, 为结肠癌的诊断和治疗提供一条新的途径. 但有关RUNX3基因的表达调节、RUNX3转录因子的作用机制及是否与其他癌基因和/或抑癌基因存在相互关联作用还不十分清楚, 有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001; 61: 249-255
- 2 Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 22
- 3 Hustinx SR, Leoni LM, Yeo CJ, Brown PN, Goggins M, Kern SE, Hruban RH, Maitra A. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol* 2005; 18: 959-963
- 4 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 5 Nakano T, Tani M, Nishioka M, Kohno T, Otsuka A, Ohwada S, Yokota J. Genetic and epigenetic alterations of the candidate tumor-suppressor gene MYO18B, on chromosome arm 22q, in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43: 162-171
- 6 Kobatake T, Yano M, Toyooka S, Tsukuda K, Dote H, Kikuchi T, Toyota M, Ouchida M, Aoe M, Date H, Pass HI, Doihara H, Shimizu N. Aberrant methylation of p57KIP2 gene in lung and breast cancers and malignant mesotheliomas. *Oncol Rep* 2004; 12: 1087-1092
- 7 Fang JY, Lu J, Chen YX, Yang L. Effects of DNA methylation on expression of tumor suppressor genes and proto-oncogene in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1976-1980
- 8 Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 163: 1101-1107
- 9 Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2003; 94: 360-364
- 10 Ehrlich M. The controversial denouement of vertebrate DNA methylation research. *Biochemistry* 2005; 70: 568-575
- 11 Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Rennie JA, Appleby P, Harris N, Gout S, Emery PW, Sanders TA. Influence of folate status on genomic DNA methylation in colonic mucosa of subjects without colorectal adenoma or cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 838-842
- 12 Kim TY, Jong HS, Jung Y, Kim TY, Kang GH, Bang YJ. DNA hypermethylation in gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 131-142
- 13 Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. *Br J Cancer* 2002; 86: 1888-1892
- 14 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-3229
- 15 Inoue K, Ozaki S, Shiga T, Ito K, Masuda T, Okado N,

■名词解释

RUNX3是一种新发现的定位于1p36.1的抑癌基因, 他是RUNT基因家族成员之一. 其编码蛋白是一种DNA结合转录因子, 在细胞的生长、发育及凋亡过程中起着重要的作用.

同行评价

本文选题新颖,叙述完整,结论正确,有一定的临床意义。

- Iseda T, Kawaguchi S, Ogawa M, Bae SC, Yamashita N, Itoharu S, Kudo N, Ito Y. Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat Neurosci* 2002; 5: 946-954
- 22 Fainaru O, Woolf E, Lotem J, Yarmus M, Brenner O, Goldenberg D, Negreanu V, Bernstein Y, Levanon D, Jung S, Groner Y. Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *EMBO J* 2004; 23: 969-979
- 18 Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y, Negreanu V, Goldenberg D, Lotem J, Ben-Asher E, Lancet D, Levanon D, Groner Y. The RUNX3 gene--sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001; 279: 221-232
- 23 Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Sowter HM, Delhanty JD, Ponder BA, Kouzarides T, Caldas C. Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* 2000; 24: 300-303
- 19 Habtemariam B, Anisimov VM, MacKerell AD Jr. Cooperative binding of DNA and CBFbeta to the Runt domain of the CBFalpha studied via MD simulations. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 4212-4222
- 24 Li J, Kleeff J, Guweidhi A, Esposito I, Berberat PO, Giese T, Buchler MW, Friess H. RUNX3 expression in primary and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57: 294-299
- 20 Javed A, Barnes GL, Jasanya BO, Stein JL, Gerstenfeld L, Lian JB, Stein GS. runt homology domain transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: evidence for promoter context-dependent activity of Cbfa proteins. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2891-2905
- 25 Jackson-Grusby L, Laird PW, Magge SN, Moeller BJ, Jaenisch R. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4681-4685
- 21 Telfer JC, Rothenberg EV. Expression and function of a stem cell promoter for the murine CBFalpha2 gene: distinct roles and regulation in natural killer and T cell development. *Dev Biol* 2001; 229: 363-382
- 26 Kim SH, Bae SI, Lee HS, Kim WH. Alteration of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in colorectal neoplasms in sporadic and familial adenomatous polyposis patients. *Mol Carcinog* 2003; 37: 32-38
- 27 Zhang S, Kong WJ, Wang YJ, Han YC, Zhang D. Inhibitory effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on human nasopharyngeal carcinoma xenograft in nude mice. *Aizheng* 2005; 24: 1201-1205
- 28 Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 95-101

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

更正与说明专栏

本刊讯《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道,特设“更正与说明”固定专栏,包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目,不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明,而且针对文章的学术水平等进行讨论。在此,我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》,给更正与说明栏目投稿。投稿者凭文章的编号,可免费注册(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>)使用中国生物医学基金论文摘要库3年。中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要。这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大计划项目基金资助,内容丰富、数据准确,体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向,可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供思路。(世界胃肠病学杂志社 2005-01-18)

促胃肠动力药的作用机制及临床应用研究进展

石刚, 吴硕东

石刚, 吴硕东, 中国医科大学第二临床医院第一微创胆道外科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 吴硕东, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学第二临床医院第一微创胆道外科 tenoutten@yahoo.com.cn

电话: 024-83955058

收稿日期: 2005-11-08

接受日期: 2005-12-17

摘要

促胃肠动力药包括很多种类, 这类药物有着不同的化学结构及作用机制, 对从食管到结肠的胃肠道的不同部位有着不同程度的促动力作用。同时, 这类药物对胆道系统的影响也逐渐受到研究者的关注。这类药物对胃肠道及胆道作用机制的研究包括: 胆碱能机制、肾上腺能机制、抗多巴胺和抗胆碱酯酶机制、神经体液机制等。促胃肠动力药临床上广泛应用于慢性胃炎、反流性食管炎 (GERD)、胃瘫、功能性消化不良 (FD) 等疾病的治疗。

关键词: 促胃肠动力药; 多潘立酮; 西沙必利; 莫沙必利; 替加色罗; 伊托必利

石刚, 吴硕东. 促胃肠动力药的作用机制及临床应用研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(2):189-196

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/189.asp>

0 引言

促胃肠动力药, 包括甲氧氯普胺、多潘立酮、西沙必利、莫沙必利、替加色罗、伊托必利、红霉素等, 广泛应用于临床。该类药物的作用机制还没有完全明确, 尤其对胆囊及Oddi括约肌的作用, 实验结果不尽一致。该类药物对于胆道的作用报道很少, 需进一步研究。现对胃肠动力药的作用机制及临床应用研究进展加以综述。

1 促胃肠动力药的分类

临床上常用的促胃肠动力药有四代。第一代如甲氧氯普胺, 商品名为胃复安、灭吐灵, 是具有胆碱能特征的多巴胺受体拮抗剂。甲氧氯普胺有较多的中枢性副作用, 早期用于治疗上消化道动力障碍如功能性消化不良、胃轻瘫等, 目前已经被二代, 第三代及第四代促动力药所代替, 但由于胃复安有注射剂, 并有止吐作用, 临

床上目前多作为止吐药使用^[1,2]。第二代促动力药是多潘立酮, 商品名为吗丁啉, 为外周多巴胺受体阻滞剂^[3], 临床应用广泛。第三代是西沙必利, 是一种化学结构上取代了烷化苯丙咪唑的甲氢氯普胺。但近年临床发现在西沙必利高敏患者中可出现Q-T间期延长或导致尖端扭转性室性心动过速^[4], 对于其在临床进一步应用, 还有着很大的争议。第四代莫沙必利, 为非选择性5-HT₄受体激动剂, 是新型促胃肠动力药物。安全、有效, 临床正在广泛使用^[5,6]。目前最新的胃肠动力药为替加色罗和伊托必利, 分别为5-HT₄受体部分激动剂^[7,8]和多巴胺受体阻滞剂^[9-11]。另一种促动力药为红霉素, 具有胃动素样的促动力效应^[12,13], 在促胃肠动力方面是研究的热点, 但由于其上腹痛、恶心、呕吐等不良反应明显, 限制了其临床应用。

2 促胃肠动力药的药代动力学

目前该类药, 推荐给药方式为口服给药。多潘立酮口服吸收迅速, 达血药峰浓度的时间为15-30 min, 与小肠组织有较高的亲和力。在食管、胃、小肠具有较高的浓度, 血浆次之, 脑内几乎没有分布。西沙必利口服后吸收迅速、完全, 1-2 h内达血药峰浓度。半衰期为10 h。其口服生物利用度约40%, 血浆蛋白结合率为97.5%。主要分布于胃和肠组织内。莫沙必利经口服给药, 0.8 h达血药峰浓度, 血浆蛋白结合率99%。主要从胃肠道吸收, 分布以胃肠道、肝、肾局部药物浓度为最高^[4,5]。替加色罗口服给药, 血药峰浓度为1 h, 绝对生物利用度为10%^[14]。伊托必利口服给药, 血药峰浓度时间为30 min, 蛋白结合率为96%, 在胃肌肉层中浓度为血液中药物浓度的二倍^[8,9]。

3 促胃肠动力药对胃肠动力的作用及机制

3.1 促胃肠动力药对胃肠动力的作用 多潘立酮主要作用于胃肠道, 对脑的影响很小。多潘立酮高度亲和力集中在上消化道^[3], 主要作用部位为近端胃肠道^[15]。通过增加胃窦及十二指肠的蠕动

■背景资料

促胃肠动力药是胃肠研究方面的热点。随着消化研究的进展及药物的研发, 新一代的、选择性更高的胃肠动力药不断出现, 对于胃肠动力药的认识也逐渐深入。但是, 目前对于胃肠动力药的研究还没有进行到基因水平及分子水平, 甚至大部分只停留在临床研究。

■同行评价

本文比较系统的综述了促胃肠动力药的作用机制及临床应用研究进展,参考文献引用广泛,论述合理,有一定参考价值.

幅度和频率,胃的收缩和蠕动加强,胃内固体和液体的排空速度加快,还可协调胃窦和十二指肠运动^[3].由于不易通过血脑屏障,极少引起锥体外系的不良反应^[15].健康志愿者试验表明,口服多潘立酮后,食管下括约肌压力持续上升^[16].Grande *et al*^[17]认为,溃疡性食管炎患者口服多潘立酮后,食管下段压力增高,而不影响食管体部的运动及食管酸暴露时间.健康人试验表明,多潘立酮对胃液成分无明显影响.

西沙必利可显著提高食道、胃、小肠及大肠的推进运动,对整个胃肠道包括从食管到肛门括约肌均有促动力作用,能增强生理反应,恢复正常的动力模式,为全胃肠动力药^[18].在食道,西沙必利可以增强食道蠕动和下食道括约肌张力,防止胃内容物反流入食道,并改善食道的清除率.在胃,西沙必利可以增加胃和十二指肠收缩性与胃窦-十二指肠的协调性,可以减少十二指肠胃反流,改善胃和十二指肠的排空.在小肠及大肠,西沙必利可以加强肠运动,并且促进小肠和大肠的转运^[18].西沙必利不增加基础胃酸及五肽胃泌素引起的胃酸分泌,不影响血浆催乳素水平,不影响精神活动及血压,呼吸频率,体温,体重和抗凝血功能.西沙必利不是抗多巴胺药物,不具备抗呕吐作用.西沙必利在一定条件下,可延缓心脏再极化,从而引起QT间期延长,导致尖端扭转型室性心动过速^[4,20].

莫沙必利为5-HT₄受体激动剂,是第一个没有D2受体拮抗作用的胃动力药^[4,5].可加强并协调胃肠运动,防止食物滞留与反流,增强胃及十二指肠运动^[19].对小肠和结肠的作用仍存在争议,一些研究认为莫沙必利能够加强小肠和结肠的运动^[20-23],而另一些研究则认为对小肠及结肠的运动没有影响^[24].有研究发现莫沙必利能增强直肠-直肠,直肠-肛管反射^[25,26].另有研究发现,莫沙必利显著缩短了荷兰猪结肠转运时间,从而认为,莫沙必利对荷兰猪全结肠均有促动力作用^[19].在Parkinson病患者,莫沙必利缩短了全结肠转运时间^[27].健康受试者试验表明,莫沙必利强效增强胃肠运动的同时,不影响胃酸分泌.莫沙必利与中枢神经原突触膜上的多巴胺D₂,A₁,5-HT₁,5-HT₂受体无亲和力,因而没有这些受体阻滞所引起的锥体外系综合征.研究表明,尽管莫沙必利的结构也是与西沙必利相似的苯甲酰胺类,但没有与西沙必利相似的导致尖端扭转型室性心动过速的电生理特征^[28],对心率、血压及心电图均无影响^[29].

Ji *et al*^[30]研究了替加色罗对离体荷兰猪小肠周期运动波的影响,认为替加色罗可引起小肠环行肌的收缩,但对最大收缩幅度没有影响.Tsubouchi *et al*^[31]在狗的在体及离体试验中证明,伊托必利对从胃到结肠的全胃肠道的收缩均有刺激作用.在荷兰猪及鼠,伊托必利加速了结肠转运.

3.2 促胃肠动力药对胃肠道的作用机制 该类药物的作用机制尚未完全清楚.多潘立酮主要作用部位是下丘脑以外的第四脑室底部的化学感受器触发区,极少通过血脑屏障.与D₂受体(dopamine 2 receptor),特别是胃肠道的多巴胺受体亲和力较强,无胆碱能活性,不受阿托品的抑制作用^[32].D₂受体是动物和人类胃肠道主要的受体亚群.多巴胺发挥抑制神经递质的作用,阻断了多巴胺对胃肠道平滑肌的抑制作用.豚鼠的动物试验表明,多潘立酮能阻滞多巴胺诱导的胃松弛,但不能降低胃平滑肌对多巴胺的反应^[32].Takahashi *et al*^[3]报道,多潘立酮通过松弛肌间神经丛的突触后胆碱能神经元,对多巴胺起抑制作用,从而激发蠕动.Marzio *et al*^[33]研究发现,在人体,多巴胺可能是通过改变肽类激素水平,从而影响消化间期胃肠运动的.进餐后期给予患者静注多巴胺,血浆胃动素水平显著升高,生长抑素水平没有变化.进食后胃肠运动特征被打乱,抑制胃窦运动波,增强十二指肠三期复合运动.多潘立酮能完全阻断多巴胺的这种效应.有研究者认为,多潘立酮对胃肠的作用主要与胃动素和生长激素水平有关^[34].

西沙必利为非选择性5-HT₄受体激动剂,通过兴奋胃肠道胆碱能中间神经元及肌间神经丛的5-HT₄受体,促进ACh的释放,发挥促胃肠动力作用^[10].但与大脑突触膜上多巴胺D₂受体,5-HT₁,5-HT₂受体无亲和力,因而没有这类受体阻滞所引起的锥体外系的副作用.在西沙必利高敏患者中可出现Q-T间期延长,或导致尖端扭转型室性心动过速^[4].

莫沙必利为5-HT₄受体激动剂,是第一个没有D2受体拮抗作用的新型胃动力药.动物实验发现,莫沙必利可以抑制GR113808 (5-HT₄受体的亲和剂)与5-HT₄受体的特异性结合,结合的抑制作用,莫沙必利弱于西沙必利^[36,15].同样在人体试验中,在胃壁肌层及肌间神经丛内,莫沙必利抑制了5-HT₄与^[125]I-SB207710 (5-HT₄选择性特异性放射配基)位点的结合^[22].多种动物试验表明,莫沙必利可以改善由顺铂引起的大鼠

胃排空延迟, 剂量依赖性地增强大鼠的液体或者固体食物的胃排空速度, 改善手术造成的大鼠胃及十二指肠排空延迟。在长期植入张力计的清醒狗中, 促进胃窦和十二指肠运动, 松弛氯化铵甲酰导致的大鼠食管收缩。增强豚鼠回肠电刺激引起的收缩, 高剂量的5-HT₄受体拮抗剂, 如曲匹西龙能拮抗之。大量研究表明, 莫沙必利通过兴奋肌间神经丛的5-HT₄受体, 刺激乙酰胆碱释放, 增强胃及十二指肠运动^[21-23]。Ruth *et al*^[35]在食管胃反流疾病 (GERD) 患者中研究发现, 莫沙必利对于食管肌肉的收缩总数及推进能力, 没有显著作用, 但是能增加食管肌肉单次收缩的时程及波幅, 食管酸度pH<4所占时程也显著缩短。与西沙必利相对比, 对于食管酸度变化及食管运动功能改善, 优于西沙必利。莫沙必利对小肠及结肠运动的作用还存在争议。Ji *et al*^[19]研究发现, 在荷兰猪试验模型中, 莫沙必利显著增高胃壁及小肠肌肉的电刺激收缩波幅, 增加了收缩期波峰的数量及收缩周期的推进速度, 而且这种作用是剂量依赖性的, 莫沙必利也缩短了荷兰猪结肠的转运时间, 结论是莫沙必利对荷兰猪全胃肠道都具有促动力作用。在其他动物实验中, 如离体大鼠结肠, 给予莫沙必利, 不影响阈压力和反射收缩的推进距离, 但是显著提高推进压力, 对远端结肠的静息肌肉张力没有影响。在豚鼠的离体实验中, 结果显示其几乎不影响豚鼠结肠的运动。Inui *et al*^[23]研究表明, 5-HT₄受体在荷兰猪结肠的分布与人类相似, 在植入换能器的清醒荷兰猪结肠运动的实验中, 胃内注入莫沙必利或西沙必利, 结肠运动明显增强。这种增强作用能被5-HT₄受体阻断剂阿托品或GR113808所拮抗; 不能被5-HT₁和5-HT₂受体拮抗剂二甲麦角新碱拮抗; 能被5-HT₃受体阻断剂盐酸恩丹西酮拮抗; 能被快速激肽 NK₁受体拮抗剂CP-99994所拮抗。荷兰猪结肠的离体实验显示, 莫沙必利及西沙必利抑制了选择性放免配基 (¹²⁵I)-SB207710与其的特异结合, 从而证明, 莫沙必利通过作用于荷兰猪的5-HT₄受体加强了结肠运动^[22,23,36]。Shimatani *et al*^[25]研究认为, 莫沙必利是通过5-HT₄受体引起乙酰胆碱释放增多而增强直肠-直肠, 直肠-肛管反射的。Itoh *et al*^[37]在健康志愿者试验中, 单次口服莫沙必利15 mg, 血浆莫沙必利水平在第60 min后达峰值, 然后下降。血浆胃动素水平也在服药60 min后达峰值, 120 min后恢复到基础水平。血浆胃泌素水平在服药60 min后上升, 血浆生长抑素水平没有

明显改变。这些结果表明, 莫沙必利对消化道功能的药理作用可能与人血浆中促动力的活性物质水平密切相关。其作用机制主要是选择性地促进肠肌层神经丛节后乙酰胆碱的释放, 从而增强胃肠的运动。莫沙必利的这种作用不影响黏膜下神经丛, 因此不改变黏膜的分泌, 不影响胃酸分泌。莫沙必利对5-HT₃受体有阻断作用, 其强度与西沙必利相似^[22]。与中枢神经原突触膜上的多巴胺D₂, A₁, 5-HT₁, 5-HT₂受体无亲和力, 因而没有这些受体阻滞所引起的锥体外系综合征。在离体豚鼠右心室乳头肌, 莫沙必利不延长动作电位时程。西沙必利浓度依赖性延长动作电位时程^[38]。

有研究表明, 替加色罗对人重组5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}受体均有亲和力^[39]。Iwanaga *et al*^[40]认为, 伊托必利通过抗多巴胺和抗胆碱脂酶机制对胃动力产生影响。

4 促胃肠动力药对胆道的作用及机制

4.1促胃肠动力药对胆囊及Oddi括约肌的作用
Chen *et al*^[41]通过临床实验, 探讨了多潘立酮对胆汁反流性胃炎患者及正常对照者空腹及餐后胆囊运动的影响及血浆胃动素水平的关系。结果显示, 多潘立酮能增加功能性胆汁反流性胃炎患者的胆囊收缩功能, 这种作用可能不依赖于血浆胆囊收缩素(CCK)和胃动素水平。而在健康对照组, 口服多潘立酮后, 胆囊排出量却显著减少。

西沙必利对胆囊运动的作用, 存在着争议, 有的研究结果是促进作用, 有的研究结果显示抑制作用。Partankar *et al*^[42]通过前瞻性临床试验发现, 在健康对照组给予西沙必利后, 无论空腹容积 (FV) 或餐后胆囊残存容积 (RV) 或排胆量都没有显著改变。在迷走神经切断术后的患者, 排胆量减少, 空腹和餐后胆囊残存容积增高, 与健康组对比, 差异有显著性。给予西沙必利后, 空腹胆囊容积没有显著变化。两组在餐后给予西沙必利后, 排胆量都没有显著变化。无论在迷走神经干切断术还是在健康受试者中, 血浆CCK水平在实验餐后增高, 西沙必利没有明显改变餐后胆囊排空能力及CCK水平。吕宾 *et al*^[43], 以超声法观察西沙必利对人胆囊收缩功能的影响, 结果显示, 单剂量口服西沙必利10 mg后, 30 min可引起正常人空腹胆囊体积明显缩小, 至120 min恢复原来状态, 对于正常人脂餐后胆囊收缩无明显影响, 胆囊结石及息肉患者脂餐后

胆囊残余体积百分率较正常组大,表明胆囊排空低下,经西沙必利短期治疗后,胆囊排空能力增加。但西沙必利对正常人胆囊的收缩功能无影响^[43,44]。Versey *et al*^[18]的随机对照临床实验结果显示,西沙必利对胆囊无促动力作用,空腹及餐后给与西沙必利后胆囊容积均增高。有试验表明,在功能性消化不良的患者中,西沙必利可以促进胆囊排空^[45]。在金黄地鼠胆固醇结石模型实验中,给予西沙必利后,收缩功能减弱的成石胆囊的收缩功能明显恢复。应用西沙必利改善胆囊收缩功能可能减少胆固醇结石的形成^[46]。Nakayama *et al*^[47]研究表明,给予了西沙必利的狗胆囊张力和自主收缩波幅是增强的。其他人体实验也证明了西沙必利诱导的胆囊收缩增强^[33]。Fu *et al*^[48]在胆囊结石患者中的研究结果显示,服药前相对胆囊收缩率 (PRGC) 较低,服用西沙必利后PRGC提高幅度增大。西沙必利恢复和提高了胆囊结石患者的收缩功能。

Nakayama *et al*^[47]在狗的体内实验中,静脉给予不同剂量西沙必利,胆道口括约肌(SO)收缩波幅增加,SO的张力减弱。Baker *et al*^[49]在澳大利亚负鼠实验中证明,各种剂量的西沙必利对SO运动的波幅和频率均产生抑制作用,导致SO松弛,这种抑制作用是剂量依赖性的,在西沙必利剂量和SO活动百分数之间存在负线性量效反应关系。西沙必利对SO基础压力没有影响。西沙必利无论是快速团式注入或是缓慢注入均对SO运动起抑制作用,而不影响SO基础压力。迷走神经切断或给与六羟季胺,二甲麦角新碱等肾上腺及胆碱能阻滞剂条件下,不能改变西沙必利对负鼠SO的作用。应用改良Caroli装置及内窥镜经T管窦道逆行插管进行SO压力测定,给予患者舌下含服西沙必利,进行服药前后SO压力变化的临床对照试验。试验结果表明,给药后SO压力较实验前明显降低,从而证明了西沙必利对人SO运动的抑制作用^[50]。莫沙必利对胆道的作用,至今尚无报道。

Fisher *et al*^[51]通过随机、双盲、交叉对照实验,对健康女性和患有肠易激惹综合征的女性口服马来酸替加色罗后,消化期及消化间期胆囊运动及Oddi括约肌功能状态进行了评估。口服马来酸替加色罗2 wk后,胆囊排胆分数、排胆率、排胆周期、空腹胆囊容积、餐后胆囊容积及胆囊最大排空均没有变化。餐前和餐后60 min血浆CCK水平也没有变化。在餐前45 min至餐后60 min,每间隔15 min测定胆囊体积、胆总

管内径及肝总管内径。结果显示,在胆囊排空的同时,肝总管及胆总管内径没有变化。从而认为,马来酸替加色罗并没有收缩Oddi括约肌,引起胆汁向十二指肠排空受阻,从而增加胆道压力,导致肝总管及胆总管内径增粗。

4.2 促胃肠动力药对胆道的作用机制 促胃肠动力药对胆道的作用机制研究非常少,尚无定论。目前存在各种争议,主要有受体机制、胆碱能机制、非胆碱能、非肾上腺素能机制等。

4.2.1 促胃肠动力药对胆囊的作用机制 多潘立酮对于正常人的胆囊排空减低的作用,可能是通过抑制SO的收缩而实现的,而不依赖于胃动素^[45]。

胆囊壁上已经确认存在乙酰胆碱受体,介导胆囊收缩。西沙必利可能直接作用于存在于迷走神经或胆囊壁上的胆碱能受体,从而引起胆囊收缩,也可能间接通过抑制SO运动,降低SO压力,从而增强胆囊排空^[52]。西沙必利能够促进胃排空,可能通过餐后胆囊收缩的肠期因素胆囊收缩素CCK发挥作用,从而促进胆囊收缩。西沙必利可以促进胆囊的再充盈,从而胆囊收缩活动加强。Partankar *et al*^[42]通过对正常人和迷走神经切断术后患者服用西沙必利后对胆囊排空作用的临床研究分析表明,迷走神经切断术后的患者,排胆量减少,空腹和餐后胆囊残存容积均增高,而健康对照组空腹胆囊容积 (FV) 及餐后胆囊残存容积 (RV) 或排胆量都没有显著改变。西沙必利可能通过迷走神经维持空腹胆囊张力及调节CCK水平诱导的胆囊运动,提示西沙必利可能通过胆碱能机制对胆囊起作用。西沙必利可能间接通过肠肌间神经元释放乙酰胆碱。

4.2.2 促胃肠动力药对SO的作用机制 Baker *et al*^[49]实验表明,西沙必利抑制了Oddi括约肌的运动。他们认为切断迷走神经,没有改变西沙必利对负鼠SO运动的影响,西沙必利对SO作用,可能不是中枢神经系统通过迷走神经调节;在河豚毒素存在条件下,西沙必利对SO的抑制反应被阻断,提示可能有神经递质调节机制;六羟季胺没有改变SO对西沙必利的反应,提示可能有神经节后机制;二甲麦角新碱没有改变西沙必利诱导的SO松弛,排除了5HT₁及5HT₂诱导的5HT调节机制。肾上腺素能及胆碱能阻滞剂不影响西沙必利对SO的作用,提示西沙必利对SO运动的抑制作用可能是通过非胆碱能,非肾上腺素能(NANC)神经元调节的^[6]。研究结果提示,西沙必利对负鼠SO的效应,与8肽CCK对人SO的作用

相似, 西沙必利可能对人SO运动产生抑制作用, 从而松弛SO^[6]. 这在经T管SO压力测定中也得到了证实^[50].

5 其他促胃肠动力药对胃肠动力及胆道动力的作用及机制

甲氧氯普胺可作用于胃肠道和中枢神经系统, 兼有促动力和止吐的功效^[1,2]. 可增加食管下端括约肌的张力, 使其压力增加, 防止胃内容物反流至食管, 还可增加食管和胃的蠕动, 促进胃的排空. 红霉素在胃和十二指肠部位有明显的促动力效应, 但对食管和远端小肠、大肠无明显促动力作用^[54]. 由于其导致强烈的胃窦、十二指肠收缩, 产生明显不良反应如上腹痛、恶心、呕吐等, 这些副作用限制了其临床应用. 作为促动力药使用时, 主要是当胃轻瘫用西沙比利、吗丁啉或胃复安治疗无效或不能耐受时才采用. 在兔的动物试验中, 红霉素对消化间期胆囊有兴奋作用^[53]. 也有研究者认为, 红霉素对离体胆囊的收缩的直接作用是抑制的^[54,55]. 红霉素可提高空腹及餐后胆囊的排空, 降低胃大部切除术后患者的上消化道症状^[12,13]. 经内镜测压证明, 红霉素可降低Oddi基础压力, 减慢Oddi节律收缩频率^[56].

6 促胃肠动力药的临床应用

6.1 慢性胃炎 在有上消化道症状的慢性胃炎患者中, 莫沙必利与西沙必利的疗效没有显著性差异, 上腹部饱胀感和上腹部重压感等主要症状显效和有效的累积百分比分别为74.8%和75%. 435例的随机双盲对照临床试验结果表明, 莫沙必利对患者烧心症状改善为74%, 恶心呕吐等症状改善率为77%. 伊托必利对非溃疡型消化不良或慢性胃炎患者有良好的治疗效果及耐受性, 对心电图QT间期、血生化指标及肝肾功能均无影响^[57,58].

6.2 反流性食管炎(GERD) 在随机, 双盲, 交叉安慰剂对照试验中, 莫沙必利对GERD治疗的效果显著优于安慰剂, 症状的改善率达80%以上. 莫沙必利能治愈或减轻内镜下食管炎程度, 改善反流屏障, 增强食道清除力, 加快胃排空, 减少胃食管返流. 莫沙必利是治疗反流性食管炎的一种比较合理的方法^[59]. 莫沙必利能够增强食管体部的蠕动收缩, 增加下食管括约肌压力, 加速胃排空, 因而可以减轻食管返流, 治愈反流性食管炎. 研究表明, 在用莫沙必利而无抑酸药的情况下, 其疗效与抑酸药奥美拉唑具有可比

性, 进一步说明了莫沙必利对反流性食管炎的疗效^[35]. 实验证明, 莫沙必利与西沙必利的疗效没有显著性差异. 多潘力酮对腐蚀性返流性食管炎的食管运动并不能迅速起效^[15]. 伊托必利100 mg tid po对GERD的治疗也是安全有效的^[60]. Pritchard *et al* ^[61]认为, 对于1个月到11岁的儿童GERD患者, 多潘立酮没有确切的治疗效果.

6.3 胃瘫 促胃肠动力药用于胃轻瘫综合征, 或上消化道不适, 也可用于由神经损伤、神经性食欲缺乏、迷走神经切断术或部分胃切除引起的胃轻瘫或糖尿病胃瘫^[4,5,13,62]. 临床试验表明, 用胃排空评估胃运动功能, 口服莫沙必利4 wk后, 患者胃排空延迟率从治疗前69%降低到52%, 胃排空显著改善^[45].

6.4 功能性消化不良(FD) 对于FD, 病因尚不清楚, 但部分研究显示, 其胃动力减弱, 胆囊排空功能下降, 口服西沙必利后, 胆囊排空功能改善, Marzio *et al* ^[45]的双盲对照实验结果证明, 胆囊排空低下而胃排空正常的FD患者口服西沙必利后, 胆囊排空功能明显改善. 莫沙必利与多潘立酮对比, 以标准试餐加X线钡条检查作为评价胃排空的试验手段, 莫沙必利在治疗2 wk和4 wk后, 对于改善早饱症状的总有效率分别为90%和100%, 略优于多潘立酮组, 对于改善上腹胀症状的总有效率分别为95%和95%与多潘立酮组在统计学上均无明显差异, 是安全有效的^[63,64]. 有人将法莫替丁、莫沙必利联合应用治疗功能性消化不良, 效果更明显^[65]. 莫沙必利显著改善了功能性消化不良患者的症状及生存质量^[66].

6.5 肠易激惹综合征(IRS) Fried *et al* ^[67]通过临床试验证明, 应用替加色罗治疗Rome II型的非腹泻型IRS患者, 是安全、有效、具有良好耐受性的. 替加色罗可以缓解IRS患者腹痛、不适、腹部饱胀、便秘等症状^[68-70]. Kellow *et al* ^[71]也证明, 对于亚太地区的IRS患者, 替加色罗6 mg, Bid, po是安全、有效的. 替加色罗在12 mo常规剂量治疗是安全的, 没有引起血生化及心电图的改变.

6.6 老年功能性便秘 老年功能性便秘多为动力性便秘, 临床试验, 以结肠转运时间、排便费力、粪便干结、排便不尽感、排便量及排便次数为疗效评价标准, 结果显示, 莫沙必利治疗老年功能性便秘有效率达88.46%, 全结肠及节段结肠转运时间明显缩短^[72]. 莫沙必利对于Parkinson病患者的便秘症状也有明显改善^[27].

6.7 假性肠梗阻 促胃肠动力药可改善蠕动不足

和胃肠内容物滞留,是安全有效的。

6.8 新生儿喂养困难 新生儿喂养困难是由不同疾病引起的以新生儿喂养困难为临床特征的临床综合征,与红霉素联合应用,治疗有效,临床未见明显副作用^[73]。

另外对于采取体位和饮食措施仍不能控制的幼儿慢性、过多性反胃及呕吐也可试用本类药物进行治疗。

总之,促胃肠动力药物临床应用广泛,对于其作用机制的进一步研究,有助于临床的合理用药。尤其该类药物对于胆囊及SO作用的研究,更是对临床有实际的指导意义。

7 参考文献

- Ozucelik DN, Karaca MA, Sivri B. Effectiveness of pre-emptive metoclopramide infusion in alleviating pain, discomfort and nausea associated with nasogastric tube insertion: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Clin Pract* 2005; 59: 1422-1427
- 陈绍洋, 朱萧玲, 胡胜, 张英民, 王强, 马素美, 熊利泽. 不同止吐药预防术后PCA恶心呕吐的临床观察. *临床麻醉学杂志* 2001; 17: 251-252
- Takahashi T, Kurosawa S, Wiley JW, Owyang C. Mechanism for the gastrokinetic action of domperidone. *In vitro* studies in guinea pigs. *Gastroenterology* 1991; 101: 703-710
- Thurmann PA. Adverse drugs reactions: diagnosis and assessment. *Pathologie* 2005; 8: 102-103
- Yoshida N. Pharmacological effects of the gastroprokinetic agent mosapride citrate. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1999; 113: 299-307
- 王振华. 新型消化道动力药-莫沙必利(贝络纳). *中国新药与临床杂志* 2000; 19: 11-12
- Scott LJ, Perry CM. Tegaserod. *Drugs* 1999; 58: 491-496
- Degen L, Matzinger D, Merz M, Appel-Dingemanse S, Osborne S, Luchinger S, Bertold R, Maecke H, Beglinger C. Tegaserod, a 5-HT₄ receptor partial agonist, accelerates gastric emptying and gastrointestinal transit in healthy male subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1745-1751
- 许大波, 柯美云. 新型促胃肠动力药物伊托必利. *中国新药杂志* 2002; 11: 437-439
- 丁海英, 高春环, 许凯. 新型胃肠双动力药物-伊托必利. *中国医院药学杂志* 2004; 24: 103-105
- Tsubouchi T, Saito T, Mizutani F, Yamauchi T, Iwanaga Y. Stimulatory action of itopride hydrochloride on colonic motor activity *in vitro* and *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 787-793
- Catnach SM, Fairclough PD. Erythromycin and the gut. *Gut* 1992; 33: 397-401
- Portincasa P, Altomare DF, Moschetta A, Baldassarre G, Di Ciaula A, Venneman NG, Rinaldi M, Vendemiale G, Memeo V, vanBerge-Henegouwen GP, Palasciano G. The effect of acute oral erythromycin on gallbladder motility and on upper gastrointestinal symptoms in gastrectomized patients with and without gallstones: a randomized, placebo-controlled ultrasonographic study. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3444-3451
- 许伟华. 替加色罗与功能性胃肠病. *世界临床药物* 2004; 25: 404-406
- Bradette M, Pare P, Douville P, Morin A. Visceral perception in health and functional dyspepsia. Crossover study of gastric distension with placebo and domperidone. *Dig Dis* 1991; 36: 52-58
- Mastai R, Grande L, Bosch J, Bruix J, Rigau J, Kravetz D, Navasa M, Pera C, Rodes J. Effects of metoclopramide and domperidone on azygos venous blood flow in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology* 1986; 6: 1244-1247
- Grande L, Lacima G, Ros E, Garcia-Valdecasas JC, Fuster J, Visa J, Pera C. Lack of effect of metoclopramide and domperidone on esophageal peristalsis and esophageal acid clearance in reflux esophagitis. A randomized, double-blind study. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 583-588
- Veysey MJ, Malcolm P, Mallet AI, Jenkins PJ, Besser GM, Murphy GM, Dowling RH. Effects of cisapride on gallbladder emptying, intestinal transit, and serum deoxycholate: a prospective, randomised, double blind, placebo controlled trial. *Gut* 2001; 49: 828-834
- Ji SW, Park HJ, Cho JS, Lim JH, Lee SI. Investigation into the effects of mosapride on motility of Guinea pig stomach, ileum, and colon. *Yonsei Med J* 2003; 44: 653-664
- Makimoto N, Sakurai-Yamashita Y, Furuichi A, Kawakami S, Enjoji A, Kanematsu T, Taniyama K. *In vivo* assessment of acceleration of motor activity associated with acetylcholine release via 5-hydroxytryptamine₄ receptor in dog intestine. *Jpn J Pharmacol* 2002; 90: 28-35
- Sasaki N, Okamura K, Yamada H. Effects of mosapride, a 5-hydroxytryptamine 4 receptor agonist, on electrical activity of the small intestine and cecum in horses. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1321-1323
- Sakurai, Yamashita Y, Takada K, Takemura K, Yamashita K, Enjoji A, Kanematsu T, Taniyama K. Ability of mosapride to bind to 5-HT₄ receptor in the human stomach. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79: 493-496
- Inui A, Yoshikawa T, Nagai R, Yoshida N, Ito T. Effects of mosapride citrate, a 5-HT₄ receptor agonist, on colonic motility in conscious guinea pigs. *Jpn J Pharmacol* 2002; 90: 313-320
- Tsubouchi T, Saito T, Mizutani F, Yamauchi T, Iwanaga Y. Stimulatory action of itopride hydrochloride on colonic motor activity *in vitro* and *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 787-793
- Shimatani H, Kojima Y, Kadowaki M, Nakagawa T, Fujii H, Nakajima Y, Takaki M. A 5-HT₄ agonist mosapride enhances rectorectal and rectoanal reflexes in guinea pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G389-G395
- Kojima Y, Nakagawa T, Katsui R, Fujii H, Nakajima Y, Takaki M. A 5-HT₄ agonist, mosapride, enhances intrinsic rectorectal and rectoanal reflexes after removal of extrinsic nerves in guinea pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G351-G360
- Liu Z, Sakakibara R, Odaka T, Uchiyama T, Uchiyama T, Yamamoto T, Ito T, Asahina M, Yamaguchi K, Yamaguchi T, Hattori T. Mosapride citrate, a novel 5-HT₄ agonist and partial 5-HT₃ antagonist, ameliorates constipation in parkinsonian patients. *Mov Disord* 2005; 20: 680-686
- Katoh T, Saitoh H, Ohno N, Tateno M, Nakamura T, Dendo I, Kobayashi S, Nagasawa K. Drug Interaction between mosapride and erythromycin without

- electrocardiographic changes. *Jpn Heart J* 2003; 44: 225-234
- 29 Endo J, Nomura M, Morishita S, Uemura N, Inoue S, Kishi S, Kawaguchi R, Iga A, Ito S, Nakaya Y. Influence of mosapride citrate on gastric motility and autonomic nervous function: evaluation by spectral analyses of heart rate and blood pressure variabilities and by electrogastrography. *J Gastroenterol* 2002; 37: 888-895
- 30 Ji SW, Park H, Chung JP, Lee SI, Lee YH. Effects of tegaserod on ileal peristalsis of guinea pig *in vitro*. *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 144-152
- 31 Tsubouchi T, Saito T, Mizutani F, Yamauchi T, Iwanaga Y. Stimulatory action of itopride hydrochloride on colonic motor activity *in vitro* and *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 787-793
- 32 Marzio L, Neri M, Pieramico O, Delle Donne M, Peeters TL, Cucurullo F. Dopamine interrupts gastrointestinal fed motility pattern in humans. Effect on motilin and somatostatin blood levels. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 327-332
- 33 Marzio L, DiGiammarco AM, Capone F, Neri M, Mezzetti A, Capozzi C, Cucurullo F. Effect of cisapride on human fasting gallbladder volume: a real-time ultrasonographic study. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 29: 631-633
- 34 Itoh H, Katagiri F, Ikawa K, Takeyama M. Effects of domperidone on human plasma levels of motilin, somatostatin, gastrin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1752-1756
- 35 Ruth M, Finizia C, Cange L, Lundell L. The effect of mosapride on oesophageal motor function and acid reflux in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1115-1121
- 36 Yoshikawa T, Yoshida N, Mine Y, Hosoki K. Affinity of Mosapride Citrate, a new gastroprokinetic agent, for 5-HT₄ receptors in guinea pig ileum. *Jpn J Pharmacol* 1998; 77: 53-59
- 37 Itoh H, Nagano T, Takeyama M. Effects of mosapride citrate on human plasma levels of motilin, gastrin, somatostatin and secretin. *Biol. Pharm. Bull* 2001; 24: 1072-1075
- 38 Makimoto N, Sakurai-Yamashita Y, Furuichi A, Kawakami S, Enjoji A, Kanematsu T, Taniyam K. In vivo assessment of acceleration of motor activity associated with acetylcholine release via 5-hydroxytryptamine₄ receptor in dog intestine. *Jpn J Pharmacol* 2002; 90: 28-35
- 39 Beattie DT, Smith JA, Marquess D, Vickery RG, Armstrong SR, Pulido-Rios T, McCullough JL, Sandlund C, Richardson C, Mai N, Humphrey PP. The 5-HT₄ receptor agonist tegaserod is a potent 5-HT_{2B} receptor antagonist *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 549-560
- 40 Iwanaga Y, Miyashita N, Saito T, Morikawa K, Itoh Z. Gastroprokinetic effect of a new benzamide derivative itopride and its action mechanisms in conscious dogs. *Jpn J Pharmacol* 1996; 71: 129-137
- 41 Chen SZ, Zhang KT, Chen XC, Liu W, Wang JM. Effect of domperidone on improving gallbladder emptying in patients with bile reflux gastritis. *J Fourth Mil Med Univ* 2001; 22: 167-168
- 42 Patankar R, Ozmen MM, Sanderson A, Johnson CD. Effect of cisapride on gallbladder emptying and plasma CCK in normal and vagotomized human subjects. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 543-548
- 43 吕宾, 包海标, 汤富刚, 项柏康. 西沙必利对人胆囊收缩功能的影响. *中华消化杂志* 2000; 20: 65-66
- 44 张霞, 唐承薇, 钟晓明. 西沙必利对健康志愿者胆囊排空的作用. *重庆医科大学学报* 2001; 26: 179-180
- 45 Marzio L, DiFelice F, Laico MG, Imbimbo B, Lapenna D, Cucurullo F. Gallbladder hypokinesia and normal gastric emptying of liquids in patients with dyspeptic symptoms. A double-blind placebo-controlled clinical trial with cisapride. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 262-267
- 46 Xu QW, Shaffer EA. Cisapride improves gallbladder contractility and bile lipid composition in an animal model of gallstone disease. *Gastroenterology* 1993; 105: 1184-1191
- 47 Nakayama S, Neya T, Yamasato T, Takaki M, Itano N. Effects of cisapride on the motility of the digestive tract in dogs and guinea pigs. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi* 1985; 21: 1-9
- 48 Fu XB, Jia JW, Miao LI. A clinical study on the effect of cisapride on improving gallbladder contraction function in patients with gallbladder stone. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1997; 2: 89-91
- 49 Baker RA, Saccone GT, Toouli J. Cisapride inhibits motility of the sphincter of oddi in the Australian possum. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 711-715
- 50 金俊哲, 吴硕东, 张振海, 孔静, 张强, 王伟. 经胆道镜测压观察硝酸甘油和西沙必利对Oddi括约肌作用的临床研究. *中国新医药* 2004; 13: 35-37
- 51 Fisher RS, Thistle J, Lembo A, Novick J, O'Kane P, Chey WD, Beglinger C, Rueegg P, Shi V, Dogra A, Luo D, Earnest DL. Tegaserod does not alter fasting or meal-induced biliary tract motility. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1342-1349
- 52 Von Kiedrowski R, Huijghebaert S, Raedsch R. Mechanisms of cisapride affecting gallbladder motility. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 939-944
- 53 Liu CY, Liu JZ, Li ZY. Effects of erythromycin on the motility of gallbladder in the interdigestive period in rabbits. *Basic Medical Sciences and Clinics* 2000; 20: 336-339
- 54 Nissan A, Mashriki Y, Zhang JM, Haskell Y, Freund HR, Hanani M. Direct Inhibitory Effect of Erythromycin on the Gallbladder Muscle. *J Gastrointest Surg* 1997; 1: 331-336
- 55 Nissan A, Freund HR, Hanani M. Direct inhibitory effect of erythromycin on human alimentary tract smooth muscle. *Am J Surg* 2002; 183: 413-418
- 56 Wehrmann T, Pfeltzer C, Caspary WF. Effect of erythromycin on human biliary motility. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 421-426
- 57 Shenoy KT, Veenasree, Leena KB. Efficacy and tolerability of itopride hydrochloride in patients with non-ulcer dyspepsia. *J Indian Med Assoc* 2003; 101: 387-388
- 58 Sawant P, Das HS, Desai N, Kalokhe S, Patil S. Comparative evaluation of the efficacy and tolerability of itopride hydrochloride and domperidone in patients with non-ulcer dyspepsia. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 626-628
- 59 王海勇, 俞杏萍, 郁敏敏, 刑国平. 莫沙必利治疗返流性食管炎的近期疗效. *中国新药与临床杂志* 2002; 21: 604-605
- 60 Kim YS, Kim TH, Choi CS, Shon YW, Kim SW, Seo GS, Nah YH, Choi MG, Choi SC. Effect of itopride, a new prokinetic, in patients with mild GERD: a pi-

- lot study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4210-4214
- 61 Pritchard DS, Baber N, Stephenson T. Should domperidone be used for the treatment of gastro-oesophageal reflux in children? Systematic review of randomized controlled trials in children aged 1 month to 11 years old. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 59: 725-729
- 62 Cai ZH, Wan TM, Xiao B. Curative effect in 48 patients with diabetics gastroparesis treated with mosapride citrate tablet. *Zhongxiyi Jiehe Xiaohua Zazhi* 2002; 10: 33-34
- 63 Da SP, Zhao XY, Li YB, Su HY, Deng JY. RCT on the therapeutical effect of mosapride citrate in functional dyspepsia. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae* 2001; 23: 593-595
- 64 许健明, 胡乃中, 谢惠君, 陈熙. 枸橼酸莫沙必利片治疗功能性消化不良的随机对照双盲临床试验评价. *基础医学与临床* 2001; 21: 54-55
- 65 Otake M, Jin M, Odashima M, Matsuhashi T, Wada I, Horikawa Y, Komatsu K, Ohba R, Oyake J, Hatakeyama N, Watanabe S. New strategy of therapy for functional dyspepsia using famotidine, mosapride and amitriptyline. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 42-46
- 66 Cho YK, Choi MG, Kim SH, Lee IS, Kim SW, Chung IS, Lee SY, Choi SC, Seol SY. The effect of mosapride on quality of life in functional dyspepsia. *Korean J Gastroenterol* 2004; 43: 160-167
- 67 Fried M, Beglinger C, Bobalj NG, Minor N, Coello N, Michetti P. Tegaserod is safe, well tolerated and effective in the treatment of patients with non-diarrhoea irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 421-427
- 68 Lacy BE, Yu S. Tegaserod: a new 5-HT₄ agonist. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 27-33
- 69 Schikowski A, Thewissen M, Mathis C, Ross HG, Enck P. Serotonin type-4 receptors modulate the sensitivity of intramural mechanoreceptive afferents of the cat rectum. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 221-227
- 70 Corsetti M, Tack J. Tegaserod: a new 5-HT₄ agonist in the treatment of irritable bowel syndrome. *Expert Opin Pharmacother* 2002; 3: 1211-1218
- 71 Kellow J, Lee OY, Chang FY, Thongsawat S, Mazlam MZ, Yuen H, Gwee KA, Bak YT, Jones J, Wagner A. An Asia-Pacific, double blind, placebo controlled, randomised study to evaluate the efficacy, safety, and tolerability of tegaserod in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2003; 52: 671-676
- 72 郭宏智. 莫沙必利治疗老年功能性便秘的临床观察. *江苏大学学报* 2002; 12: 664-664
- 73 Liu Y, Liu M, Liu YF, Li XR, Shi J, Chen YL, Tan YM. The study of erythromycin combined with domperidone in the treatment of neonatal feeding intolerance. *Guangxi Medical Journal* 2002; 24: 628-629

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

我国科技论文总数连续三年世界第五

本刊讯 2004年度中国科技论文统计结果于2005-12-06在北京揭晓,与上一年度相比,我国科技论文SCI论文数增长15.2%, 论文被引用篇数和次数分别增长4.4%和4.3%。更可喜的是,在过去十年间,我国论文被引用数已排在世界第14位,与上一年同一数据相比,位次提高了4位。

据介绍,2004年度《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP)共收录我国作者的论文111356篇,比上年增加93352篇,增长率为19.3%。我国科技论文占世界论文总数的6.3%,较上年增加1.2%,连续3年保持在世界第5位,前4位国家是美国、日本、英国和德国。根据生物医学专家的建议,今年在统计中新增加了美国《医学索引》(MEDLINE)检索系统,该系统是当今较权威的生物医学文献检索系统,我国大陆75种期刊被收录其中。

2004年度我国国内论文最多的学科仍是临床医学,基础医学名列第六。国内被引用次数最多的学科也是临床医学,基础医学名列第五。国际被引用论文篇数,基础医学与临床医学名列第八和第九。由于综合大学并校,高校论文产出前20位排名榜中已不见了医学院校,但在MEDLINE收录的高等院校排名中,仍可看到医学科技论文对综合大学论文排名的贡献。2004年排在SCI收录论文数第一的医疗机构是北京大学第一医院,解放军总医院在国内论文被引用次数、国内论文数和国际国内论文总数三个统计项目中,均名列医疗机构第一。

在同时公布的第四届中国百种杰出学术期刊中,22种医药卫生类期刊榜上有名。[摘自《健康报(记者张荔子)》]。

针刺疗法治疗功能性肠疾病的研究进展

李文波, 刘诗

李文波, 刘诗, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
通讯作者: 刘诗, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. shiliugao@yahoo.com
电话: 027-85726381
收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

摘要

针灸在中国已经经验性的应用了数千年, 而且在全世界范围越来越广泛的被医生和患者所接受. 功能性胃肠疾病是临床上常见疾病, 依据罗马标准, 普通人群中一种以上功能性胃肠病的患病率高达70%以上. 由于其病因与发病机制仍不明确, 所以治疗效果尚不能令人满意. 在过去的几十年里, 对于针灸对于功能性胃肠疾病的治疗及可能机制做了一些研究. 对探求针刺疗法对功能性胃肠疾病的潜在治疗作用有着重要的临床意义. 我们对已有的关于针刺疗法对于不同功能性肠疾病的治疗效果和机制研究作一综述.

关键词: 功能性胃肠疾病; 针灸; 胃肠运动; 术后肠麻痹; 肠易激综合征; 便秘

李文波, 刘诗. 针刺疗法治疗功能性肠疾病的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(2):197-200
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/197.asp>

0 引言

针灸在中国已经应用了2 500多年, 并且越来越广泛的被全世界的医生和患者所接受^[1,2]. 功能性胃肠疾病(functional gastrointestinal disorder, FGID)是临床上常见疾病, 依据罗马II标准^[3], 一种以上功能性胃肠疾病在人群中的患病率在西方国家估计高达70%^[4,5]. 功能性胃肠疾病降低了人们的生活质量^[6-9], 给卫生保健系统带来沉重的经济负担^[10-13]. 由于FGID的诊断主要根据症状, 大部分FGID的病因和发病机制仍不明确^[14], 所以治疗效果尚不能令人满意, 医生和患者都对新的治疗方法有很大的兴趣, 因此, 探求针刺疗法对FGID的潜在的治疗作用有着很重要的临床意义. 在过去几十年里, 关于针刺疗法治疗功能性胃肠疾病及其可能机制的研究不多见. 我们回

顾了文献中已有的关于针刺疗法对于功能性肠疾病的治疗和机制研究的资料, 包括术后肠麻痹, 肠易激综合征, 便秘等疾病, 总结了关于针刺疗法对不同功能障碍性肠疾病的治疗及其疗效, 并对其方法做了初步介绍.

1 理论和方法

1.1 针灸理论 针灸是传统中医(TCM)的重要组成部分. 中医理论认为人的身体是由内在和外在器官组成的动态有机体, 通过经络相互连接, 而气则随经络运行. 当人体处于平衡状态, 气则运行通畅, 构成维持器官和组织功能的必需的重要能量来源. 穴位是经络上特殊的点, 是气进入, 传出, 交汇, 聚积之处. 根据人体内的器官, 主要有12经脉, 15别络, 沿经络循行, 共有361个穴位. 健康的机体要求保持和谐的平衡, 而经络中能量流的失衡则会导致各种疾病. 针灸的基本理论是通过在特定的点, 或者与受损脏器相关的经络上数个穴位进行针刺和不同的针法处理, 促进能量的流动, 使能量恢复平衡, 从而恢复器官的功能.

1.2 针灸的实施方案 通常情况下, 针灸是用一根很细的不锈钢针插入穴位, 通过手法处理或者电刺激完成的. "手法针灸"包括针灸医生的不同的针法, 如提, 插, 捻, 转, 或者不同针法的组合. 不同的针法适用于不同的情况, 可以产生不同的效果^[15]. 这是一种传统的针灸方法, 在临床上应用广泛. "电针术(electroacupuncture, EA)"是通过将针灸针连到一个电脉冲发生器上, 通过电脉冲刺激针灸穴位. 电针术的效果似乎更加一致, 具有更好的可重复性, 在研究中应用更加普遍^[16-19]. "经皮电刺激(transcutaneous electrical acustimulation, TEAS)"或"经皮电神经刺激(transcutaneous electrical nerve stimulation, TENS)"是通过在针灸穴位或者神经区放置皮肤表面电极, 进行电刺激. TEAS和TENS很相似, 因为针灸穴位很多是沿神经区域分布的, 因此我们也回顾了一些TENS的研究^[20-22]. 针灸的其他方法包括艾灸, 针压法, 激光辐射, 电磁

■背景资料

功能性胃肠疾病是临床常见疾病, 严重影响了人们的生活质量, 由于发病原因及机制尚不明确, 疗效不能令人满意. 针刺疗法对于功能性胃肠疾病有潜在的治疗作用.

■ 创新盘点

本文对针刺疗法对于各种功能性肠疾病的治疗效果及其可能机制进行综述,总结了针刺疗法在临床的应用。

波刺激穴位等。

耳廓针灸是针灸的另一种方式,同样可以用于功能性胃肠疾病的治疗。外耳的不同区域与特定的器官功能相关,可以通过针刺、念珠等进行刺激。

1.3 与功能性胃肠疾病有关的针灸穴位 在中医中,与胃肠相关的经脉主要有手阳明大肠经,手太阳小肠经,足阳明胃经,足太阳小肠经,手厥阴心包经。沿经脉循行的穴位包括人中,内关,中脘,足三里,上巨虚,下巨虚,三阴交,脾俞,胃俞,大肠俞,小肠俞,颌谷,百汇等。

2 针灸与功能性肠疾病

2.1 术后肠麻痹 术后肠麻痹是腹部手术后最常见的并发症之一,是由于胃、小肠、结肠的运动功能原发或继发性损伤,结果导致胃肠内容物的传输延迟,食物不耐受和胀气^[23]。三项对经腹部手术的住院患者的随机对照临床试验提示针刺疗法使第一声肠鸣音出现的时间,通气时间,以及排便时间均缩短,从而证明可以加强胃肠动力^[24,25],一项临床实验显示针刺耳廓穴位和足三里可以促进术后肠道功能的恢复,减轻腹部手术后的腹胀及其他不适^[26]。

2.2 肠易激综合征 肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是功能性胃肠疾病中最常见的疾病之一,包括肠功能紊乱,与排便相关的腹部不适或者腹痛,以排便习惯改变为特征^[27,28]。IBS的患者对直肠扩张的感觉阈下降^[29,30]。

对于疼痛包括慢性内脏疼痛的治疗,针刺疗法是一种有前景的方法。在一项动物实验中,对大鼠进行结肠扩张刺激造成肠易激综合征(IBS)的模型。研究电针刺激对于IBS内脏慢性疼痛的影响。结果显示结肠直肠扩张的压力分别为20, 40, 60和80 mmHg时,电针刺激可以显著降低其异常增加的腹壁回撤反射评分以及从腹直肌记录到的肌电图(EMGs)的等级。持续进行14 d的电针刺激治疗可以发现电针刺激对于异常腹壁回撤反射和肌电图的效果在开始治疗后第2-4 d开始出现,效果逐渐增加,至第8-12 d达到最大效应,效应可以持续至电针治疗停止后5 d^[31]。

但是临床上针刺疗法对于IBS的效果并不确定。一项开放性设计^[32]的初步研究表明,经过4 wk的针灸,IBS患者的总体健康状况和胀气有所改善,但是腹部不适和排便频率并没有改善。在一项双盲对照实验中^[33],对于IBS患者,虽然针灸对其全身症状以及腹痛都有明显的改善,但

是针灸和假针灸对于症状的改善在统计学上并没有显著的差异。

最近的研究有报道针刺疗法使直肠感觉有所改善。在一项对于腹泻型IBS的研究中,通过对内关和足三里进行经皮电刺激(TEAS),评估TEAS对于直肠紧张度,顺应性和直肠对于气囊扩张的感觉的作用效果。结果显示与对照组相比,TEAS可以显著提高直肠对于气体的感觉阈,排便和疼痛阈,改善直肠感觉,但是对于直肠紧张度和顺应性并没有显著影响。因此可以得出结论,对于内关和足三里进行TEAS可以减轻IBS患者的内脏敏感性^[34]。在另一项研究中,测定腹泻型IBS,便秘型IBS,功能性便秘以及健康对照组的直肠感觉,评价经皮电神经刺激(TENS)的作用。研究结果表明腹泻型IBS患者的最初有便意的感觉,紧急排便的感觉以及疼痛的阈值明显降低。女性的直肠感觉阈显著低于男性。短期的进行TENS提高了腹泻型IBS患者的直肠感觉阈,进行为期2 mo的TEAS,使患腹泻型IBS的患者的直肠感觉阈显著提高,大便次数和腹痛程度减轻,心理评分降至正常。但是对于便秘型IBS患者和功能性便秘的患者则无效^[35]。

2.3 便秘 有关针刺疗法对于便秘功效的研究很少,文献报道的信息也很罕见。一项对于17名便秘儿童的研究结果显示,经过10 wk的治疗,与对照组相比,针刺疗法使肠运动频率和血浆阿片样物质的水平逐渐增加^[36]。但Klauser *et al*^[37]报道电针刺激治疗8例结肠无力型便秘患者,发现治疗后结肠传输时间及粪便排出频率无明显改变。

3 针灸的机制

3.1 神经机制 针灸对胃肠运动的作用是通过神经和体液通路介导的。神经通路已经有较为系统的研究。针灸麻醉大鼠的腹部和下胸部抑制胃运动,针灸其后肢则促进胃动力。针灸后肢引起兴奋性的反应,传入支是肢体的皮肤和肌肉的混合传入神经,传出支是胃迷走神经,反射中枢仍不明确,但需有脑的高级中枢存在。针灸腹部引起抑制性的反应,传入支是腹部皮肤和肌肉混合的传入神经,传出支是胃交感神经,反射中枢在脊髓。这些反射包含了不同的神经通路^[38]。Tada *et al*^[39]发现,针灸大鼠右下腹可以导致一过性的胃松弛。此效应可以被胥乙啶,普萘洛尔,内脏神经结切除术,脊髓横断,脊髓延髓切断术所阻断。而不能被N-硝基精氨酸,酚妥拉明,躯干迷走神经切

断术, 中脑延髓切断术所阻断. 针灸还可引起腹侧核c-Fos免疫阳性细胞的表达增强. 因此得出结论, 针灸引起的胃松弛是通过躯体交感神经反射实现的, 传入支是腹部皮肤和肌肉混合传入神经, 传出支是胃交感神经. 反射中枢在延髓, 延髓腹侧核神经元在此反射中可能有着重要的作用.

Noguchi *et al*^[40]还发现, 除了胃运动之外, 在大鼠中, 针灸对十二指肠运动的抑制作用是通过脊髓反射完成的, 包括内脏神经的参与, 兴奋性反应是迷走神经参与的高位脊髓反射.

3.2 体液机制 体液通路包括胃泌素, β -内啡肽和生长抑素(SS)的释放. 经过针灸, 犬胃窦的G细胞内的胃泌素的量增加, 提示G细胞中胃泌素储存增加, 释放减少^[41]. 此外, 针灸不仅可以减少十二指肠溃疡患者异常的高G细胞数量, 而且可以增加慢性萎缩性胃炎患者异常的低G细胞数量^[42].

Jin *et al*^[43]发现电针术可以抑制狗的餐后胃酸分泌. 同时, 血浆中的SS和 β -内啡肽水平增高, 胃泌素的水平减低. 纳络酮可以完全逆转电针术引起的胃酸分泌和血浆中肽的水平变化. 外源性的SS抑制酸分泌量.

阿片通路在针灸对胃运动的促进和抑制作用中均有作用. 针灸大鼠后肢引起III期样的收缩, 纳络酮可以缩短针灸效果持续的时间^[44]. 而灌入纳络酮可以拮抗针灸引起的狗的运动抑制作用^[42].

研究发现5-羟色胺(5-HT)在调节胃动力方面起着重要的作用. 针灸人中穴可以抑制狗的胃窦运动, 同时血液5-HT水平下降, 肠嗜铬细胞中5-HT的强度及嗜铬细胞的数量水平上升. 通过针灸可以使旋转导致的胃节律障碍正常化, 随之5-HT在血清中水平下降, 而胃窦组织中水平上升^[45].

总之, 在本文中, 我们简要的介绍了针灸的方法学并且系统的回顾了针灸对于功能性肠疾病的治疗效果及可能机制. 千百年来, 针灸只是经验性的用于治疗各种疾病. 但在过去的几十年里, 为针刺疗法机制的研究提供了科学的证据, 使其得以广泛的应用. 现已知针刺疗法的效应可能是通过神经通路, 体液通路, 阿片样物质通路和/或5-HT通路介导的. 总之, 文献中现有的资料显示了针灸治疗功能性胃肠疾病或胃肠运动障碍的巨大潜力. 在某些领域, 针灸已有令人信服的资料, 例如治疗恶心和呕吐. 针刺疗法对于各种功能紊乱性疾病如功能性消化不良和IBS的

临床疗效仍需进一步的研究来确定.

4 参考文献

- 1 Kaptchuk TJ. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med* 2002; 136: 374-383
- 2 Diehl DL. Acupuncture for gastrointestinal and hepatobiliary disorders. *J Altern Complement Med* 1999; 5: 27-45
- 3 Spiller R. Rome II: the functional gastrointestinal disorders. Diagnosis, pathophysiology and treatment: a multinational consensus. *Gut* 2000; 46: 741B
- 4 Drossman DA, Li Z, Andruzzi E, Temple RD, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE, Janssens J, Funch-Jensen P, Corazziari E. U.S. householder survey of functional gastrointestinal disorders. Prevalence, sociodemography, and health impact. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1569-1580
- 5 Thompson WG, Irvine EJ, Pare P, Ferrazzi S, Rance L. Functional gastrointestinal disorders in Canada: first population-based survey using Rome II criteria with suggestions for improving the questionnaire. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 225-235
- 6 Koloski NA, Talley NJ, Boyce PM. The impact of functional gastrointestinal disorders on quality of life. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 67-71
- 7 Gralnek IM, Hays RD, Kilbourne A, Naliboff B, Mayer EA. The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life. *Gastroenterology* 2000; 119: 654-660
- 8 Dean BB, Aguilar D, Barghout V, Kahler KH, Frech F, Groves D, Ofman JJ. Impairment in work productivity and health-related quality of life in patients with IBS. *Am J Manag Care* 2005; 11: S17-S26
- 9 Akehurst RL, Brazier JE, Mathers N, O'Keefe C, Kaltenthaler E, Morgan A, Platts M, Walters SJ. Health-related quality of life and cost impact of irritable bowel syndrome in a UK primary care setting. *Pharmacoeconomics* 2002; 20: 455-462
- 10 Hulisz D. The burden of illness of irritable bowel syndrome: current challenges and hope for the future. *J Manag Care Pharm* 2004; 10: 299-309
- 11 Le Pen C, Ruzsiewicz P, Gaudin AF, Amouretti M, Bommelaer G, Frexinos J, Poynard T, Maurel F, Priol G, Bertin C. The burden cost of French patients suffering from irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 336-343
- 12 Badia X, Mearin F, Balboa A, Baro E, Caldwell E, Cucala M, Diaz-Rubio M, Fueyo A, Ponce J, Roset M, Talley NJ. Burden of illness in irritable bowel syndrome comparing Rome I and Rome II criteria. *Pharmacoeconomics* 2002; 20: 749-758
- 13 Patel RP, Petitta A, Fogel R, Peterson E, Zarowitz BJ. The economic impact of irritable bowel syndrome in a managed care setting. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 14-20
- 14 Wood JD, Alpers DH, Andrews PL. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 1999; 45: II6-II16
- 15 Xing W, Li Q. Effects of different manipulations of acupuncture on electrical activity of stomach in humans. *J Tradit Chin Med* 1998; 18: 39-42
- 16 Hsieh CL, Lin JG, Li TC, Chang QY. Changes of pulse rate and skin temperature evoked by electroacupuncture stimulation with different frequency on both Zusanli acupoints in humans. *Am J Chin Med* 1999; 27: 11-18
- 17 Liao JM, Lin CF, Ting H, Chang CC, Lin YJ, Lin TB. Electroacupuncture at Hoku elicits dual effect

■ 应用要点

针刺疗法在功能性胃肠疾病的临床治疗上有广泛的应用前景.

■ 名词解释

电针术(electroacupuncture, EA): 是通过将针灸针连到一个电脉冲发生器上, 通过电脉冲刺激针灸穴位。经皮电刺激(TEAS) " 或 " 经皮电神经刺激(TENS) " 是通过在针灸穴位或者神经区放置皮肤表面电极, 进行电刺激。

- on autonomic nervous system in anesthetized rats. *Neurosci Res* 2002; 42: 15-20
- 18 Chou JW, Chang YH, Chang CS, Chen GH. The effect of different frequency electrical acustimulation on gastric myoelectrical activity in healthy subjects. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 582-586
- 19 Shiotani A, Tatewaki M, Hoshino E, Takahashi T. Effects of electroacupuncture on gastric myoelectrical activity in healthy humans. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 293-298
- 20 Tarcin O, Gurbuz AK, Pocan S, Keskin O, Demirturk L. Acustimulation of the Neiguan point during gastroscopy: its effects on nausea and retching. *Turk J Gastroenterol* 2004; 15: 258-262
- 21 Coloma M, White PF, Ogunnaike BO, Markowitz SD, Brown PM, Lee AQ, Berrisford SB, Wakefield CA, Issioui T, Jones SB, Jones DB. Comparison of acustimulation and ondansetron for the treatment of established postoperative nausea and vomiting. *Anesthesiology* 2002; 97: 1387-1392
- 22 Noguchi E, Ohsawa H, Tanaka H, Ikeda H, Aikawa Y. Electro-acupuncture stimulation effects on duodenal motility in anesthetized rats. *Jpn J Physiol* 2003; 53: 1-7
- 23 Miedema BW, Johnson JO. Methods for decreasing postoperative gut dysmotility. *Lancet Oncol* 2003; 4: 365-372
- 24 Sun P. A study of subtotal gastrectomy under the acupuncture combined with epidural anesthesia of small dosage. *Zhenci Yanjiu*. 1996; 21: 11-15
- 25 Liu JX, Zhao Q. Effect of acupuncture on intestinal motion and sero-enzyme activity in perioperation. *Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1991; 11: 156-157, 133-134
- 26 Wan Q. Auricular-plaster therapy plus acupuncture at zusanli for postoperative recovery of intestinal function. *J Tradit Chin Med* 2000; 20: 134-135
- 27 Saito YA, Schoenfeld P, Locke GR 3rd. The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1910-1915
- 28 Cremonini F, Talley NJ. Irritable bowel syndrome: epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 189-204
- 29 Poitras P, Riberdy Poitras M, Plourde V, Boivin M, Verrier P. Evolution of visceral sensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 914-920
- 30 Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganier M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002; 122: 1771-1777
- 31 Cui KM, Li WM, Gao X, Chung K, Chung JM, Wu GC. Electro-acupuncture relieves chronic visceral hyperalgesia in rats. *Neurosci Lett* 2005; 376: 20-23
- 32 Chan J, Carr I, Mayberry JF. The role of acupuncture in the treatment of irritable bowel syndrome: a pilot study. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 1328-1330
- 33 Fireman Z, Segal A, Kopelman Y, Sternberg A, Carasso R. Acupuncture treatment for irritable bowel syndrome. A double-blind controlled study. *Digestion* 2001; 64: 100-103
- 34 Xing J, Larive B, Mekhail N, Soffer E. Transcutaneous electrical acustimulation can reduce visceral perception in patients with the irritable bowel syndrome: a pilot study. *Altern Ther Health Med* 2004; 10: 38-42
- 35 Xiao WB, Liu YL. Rectal hypersensitivity reduced by acupoint TENS in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 312-319
- 36 Broide E, Pintov S, Portnoy S, Barg J, Klinowski E, Scapa E. Effectiveness of acupuncture for treatment of childhood constipation. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1270-1275
- 37 Klauser AG, Rubach A, Bertsche O, Muller-Lissner SA. Body acupuncture: effect on colonic function in chronic constipation. *Z Gastroenterol* 1993; 31: 605-608
- 38 Sato A, Sato Y, Suzuki A, Uchida S. Neural mechanisms of the reflex inhibition and excitation of gastric motility elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats. *Neurosci Res* 1993; 18: 53-62
- 39 Tada H, Fujita M, Harris M, Tatewaki M, Nakagawa K, Yamamura T, Pappas TN, Takahashi T. Neural mechanism of acupuncture-induced gastric relaxations in rats. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 59-68
- 40 Noguchi E, Ohsawa H, Tanaka H, Ikeda H, Aikawa Y. Electro-acupuncture stimulation effects on duodenal motility in anesthetized rats. *Jpn J Physiol* 2003; 53: 1-7
- 41 Zhou L. The regulatory function of acupuncture of the stomach. *Zhenci Yanjiu* 1986; 11: 274-279
- 42 Liu L, Zhou L, Zhang D, Li J. Effects of acupuncture on antral G cells in patients with gastric disease. *Zhenci Yanjiu* 1994; 19: 75-78
- 43 Jin HO, Zhou L, Lee KY, Chang TM, Chey WY. Inhibition of acid secretion by electrical acupuncture is mediated via beta-endorphin and somatostatin. *Am J Physiol* 1996; 271: G524-G530
- 44 Qian LW, Lin YP. Effect of electroacupuncture at zusanli (ST36) point in regulating the pylorus peristaltic function. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1993; 13: 336-339, 324
- 45 Zhou L, Liu LG, Chen HL, Zhou WY, Li YF, Shi MH. The effect of acupuncture "renzhong" on gastric antral motility and its relation to peripheral 5-hydroxytryptamine. *Zhenci Yanjiu* 1987; 12: 130-138

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

Wnt/ β -catenin 信号通路与大肠癌的始发和防治策略

李琳娜, 袁守军

李琳娜, 袁守军, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所药理毒理研究室 北京市 100850

通讯作者: 袁守军, 100850, 北京市, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所药理毒理研究室. yuansj@nic.bmi.ac.cn

电话: 010-66930271 传真: 010-68214653

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-12-02

摘要

大肠癌的发生是一个多因素、多阶段、多基因改变渐进性累积的复杂过程. Wnt/ β -catenin 信号通路中关键成分的异常改变, 导致该通路的高度激活, 在细胞水平上表现为过度增殖, 在组织水平上表现为肠黏膜上皮转变为腺瘤性息肉. 这是大肠癌形成的重要起始环节之一. 对Wnt/ β -catenin通路中关键成分异常改变的检测是实现大肠癌早期诊断的基础. 在治疗干预方面, 一些非甾体抗炎药、COX-2抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和血管生成抑制剂等能抑制Wnt/ β -catenin通路过度激活, 而有望在大肠癌的治疗中发挥作用; 而以该通路中关键成分为靶点设计的生物制剂、小分子化合物, 已显示出良好的体外抗癌作用.

关键词: 大肠癌; β -catenin; APC

李琳娜, 袁守军. Wnt/ β -catenin信号通路与大肠癌的始发和防治策略. 世界华人消化杂志 2006;14(2):201-206

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/201.asp>

0 引言

大肠癌的发生是一个多因素、多阶段、多基因改变渐进性累积的复杂过程. Wnt/ β -catenin 信号通路中某些关键成员的基因异常改变(突变或缺失), 与大肠癌的始发密切相关, 如: APC(adenomatous polyposis coli)蛋白、 β -catenin 蛋白、Axin蛋白等, 其基因异常改变最终导致Wnt/ β -catenin信号通路的高度激活, 肠黏膜上皮过度增生, 这是进一步恶化的基本前提. 我们就Wnt/ β -catenin通路关键成员发生异常改变与大肠癌始发的关系和干预的策略, 作一概述.

1 Wnt/ β -catenin信号通路及其调控

1.1 Wnt/ β -catenin通路的关键分子是 β -catenin 细胞膜、细胞质和细胞核均存在 β -catenin^[1,2]. 细

胞膜上的 β -catenin与E-cadherin(钙依赖性上皮细胞黏附分子)、 α -catenin、actin等构成连接复合体, 介导同型细胞相互黏附^[3]. β -catenin的磷酸化决定其在该复合体中的存留: β -catenin的丝/苏氨酸磷酸化, 促进E-cadherin和 β -catenin的结合; 而表皮生长因子(EGF)、血小板衍化生长因子(PDGF)、肝细胞生长因子(HGF)等生长因子及其受体使 β -catenin的酪氨酸磷酸化, 促使 β -catenin从复合体中解离, 进入细胞质^[4-6].

胞质中的 β -catenin与Axin、APC、GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β)等形成 "破坏复合体(destruction complex)", 经蛋白酶体水解作用而降解. 未被降解的 β -catenin进入细胞核, 调节相关靶基因的转录^[1,2].

1.2 Wnt信号对 β -catenin的调节 从秀丽小杆线虫(C.elegans)到人类, 各种动物均存在wnt基因, 且序列高度保守、基因功能相似, 都参与胚胎早期的发育调控^[7]. Wnt基因编码一种富含胱氨酸的分泌型糖蛋白, 调控Wnt/ β -catenin信号通路和Wnt/Ca²⁺信号通路.

Wnt/ β -catenin通路的核心事件是调节 β -catenin的稳定性. 无Wnt信号刺激细胞时, 酪蛋白激酶CK I (casein kinase I)将细胞质中 β -catenin的Ser45磷酸化^[8,9], 磷酸化后的 β -catenin与Axin、GSK-3 β 、APC等形成 "破坏复合体", 复合体中的GSK-3 β 又相继使 β -catenin的Ser41、Thr33、Thr37磷酸化^[10-12], 而使 β -catenin能被泛素连接酶复合体E3的亚单位 β -TrCP (β -transducin repeat-containing proteins)识别, 经蛋白酶体途径被降解^[13], 因而此时细胞内的 β -catenin水平较低.

当细胞受到Wnt信号刺激时, Wnt蛋白与Frizzled受体相结合, 活化后的Frizzled受体, 募集一种特定的G蛋白(dishevelled, Dvl)至细胞膜内侧, 在辅助受体LRP5/6(low density lipoprotein receptor related protein 5/6)的协助下, 结合 "破坏复合体" 中的Axin, 使复合体解聚, 阻止了GSK-3 β 对 β -catenin的磷酸化, 避免 β -catenin经泛素-蛋白酶体途径降解^[14-16], 从而使 β -catenin稳定

■背景资料

大肠癌的发生是一个多基因改变渐进性累积的复杂过程. Wnt/ β -catenin通路关键成分发生异常改变与大肠癌始发的关系密切, 以这些关键成分为靶标的药物将成为防治肠癌的重要手段.

■研究前沿

一些非甾体抗炎药、COX-2抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和血管生成抑制剂等因能抑制Wnt/ β -catenin通路过度激活,而有望进一步开发为大肠癌的辅助治疗药物;而以该通路中关键成分为靶点设计的生物制剂、小分子化合物,已显示出良好的体外抗癌作用。

存在于胞质中,并很快进入细胞核,与转录因子TCF/LEF(T cell factor/lymphocyte enhancer factor)结合成复合体,促进TCF/LEF与特定靶基因的启动子结合,激活靶基因的转录^[17, 18]。

已知Wnt/ β -catenin通路能调节30多种基因的转录活性,目前研究较为关注调节肿瘤细胞增殖和侵袭转移的基因,包括c-myc、cyclinD1、survivin、gastrin、c-met、COX-2、FGF18、MMP-7、uPAR、CD44、VEGF、ASEF等^[19]。

2 大肠癌细胞Wnt/ β -catenin信号通路的主要基因缺陷

Wnt/ β -catenin信号通路的成员较多,在大肠癌细胞,该通路主要的基因缺陷为APC、 β -catenin和Axin的突变或缺失。最终的结果是Wnt/ β -catenin通路在无Wnt信号刺激时,保持持续激活状态。临床研究发现,70-80%的大肠癌存在APC缺失或突变^[20],而 β -catenin突变和Axin的突变发生率较低,仅发生于少数携带野生型APC的大肠癌中^[21]。Sparks *et al*^[21]观察了30个大肠癌标本,未见APC缺失或突变与 β -catenin突变同时发生。Samowitz *et al*^[22]发现 β -catenin的突变在小腺瘤中更常见,而在浸润性腺癌中并不常见。 β -catenin突变肿瘤的侵袭能力似乎不及APC缺失或突变的肿瘤。与 β -catenin的激活性突变相比,APC的缺失或突变能为细胞提供更强大的生长优势,这提示除了促进 β -catenin降解外,APC还具有其它重要作用。

2.1 APC APC突变常发生于第15个外显子5'-末端1 280-1 500密码子之间突变簇集区(mutation cluster region, MCR)^[18],即Axin结合位点,产生的截短型APC蛋白丧失与Axin结合的能力,不能形成"破坏复合体"降解 β -catenin,使 β -catenin聚集于细胞质和细胞核中^[23]。Smits *et al*^[24]培育出一种表达截短型APC蛋白的基因突变小鼠,但这种APC保留了一个Axin结合位点,可以形成"破坏复合体"降解 β -catenin,这种小鼠存活了下来,而且未产生大肠肿瘤。

APC蛋白除了可以调节胞浆中 β -catenin的稳定性,还有维持染色体稳定性的功能。Tighe *et al*^[25]观察到APC突变的小鼠胚胎干细胞显示出近四倍体的核型,APC突变的人类细胞中也出现了异常纺锤体结构和弱化的动粒-微管连接。这提示APC还具有促进纺锤体正确形成并维持细胞整倍体状态的功能。APC的突变促进了CIN(chromosome instability)的形成,这可能使突

变细胞获得更强大的生长优势。

2.2 β -catenin β -catenin最常见的突变位点是GSK-3 β 作用的磷酸化位点,即 β -catenin N末端丝/苏氨酸残基^[20]。其结果是突变的 β -catenin不能被GSK-3 β 磷酸化,逃避了 β -TrCP介导的泛素-蛋白酶体降解,稳定的存在于胞质中,且保持持续激活状态。

2.3 Axin Axin作为支架蛋白,其主要作用是构建"破坏复合体"^[17],协助GSK-3 β 磷酸化APC和 β -catenin。目前认为Axin是一种肿瘤抑制因子,发生基因缺陷,则会增强 β -catenin活性,促进肿瘤的形成^[26]。

3 Wnt/ β -catenin通路基因缺陷引发大肠癌

大肠癌形成过程中最早发现的病理变化是异常肠隐窝病灶(aberrant crypt focus, ACF)的形成^[27]。ACF中的细胞多存在APC突变或缺失,导致Wnt/ β -catenin信号通路的过度激活,从而启动大肠癌的发生^[27]。

肠隐窝上皮细胞的更新是细胞增殖、分化、向肠腔迁移这一系列事件协调发展的结果。肠隐窝底部的多能干细胞在迁移到隐窝下部时转变为原始祖细胞;当迁移到隐窝中部时分化为不同类型的细胞;到达隐窝顶部肠上皮表面时,细胞开始凋亡并落入肠腔。这个增殖和分化周期相当活跃和迅速,整个过程需要3-5d,肠道每天脱落的细胞达1 011个^[28]。

肠隐窝细胞恶性转化的第一步是APC突变或缺失造成的。在正常的肠隐窝结构中,从肠隐窝底部至顶部这个生长分化的方向来看,APC的表达呈逐渐增高趋势^[29, 30], β -catenin的核内聚集逐渐减少, β -catenin调节的靶基因如c-myc、survivin、CD44等的表达也随之沿该方向逐渐减少^[31, 32]。APC的突变不仅能引起细胞水平的变化,也会导致组织水平的异常变化。以其靶基因survivin的调节为例:正常情况下,由于隐窝底部 β -catenin核内聚集状况最为显著,Survivin在该区域的表达量最高,而这恰恰是增殖干细胞所处的区域,表明Survivin是防止这些细胞凋亡所必需的;在肠隐窝中部,APC表达逐渐增加, β -catenin核内聚集趋势明显下降,Survivin表达逐渐减少,这与该区域细胞停止增殖、开始分化成熟相关;在肠隐窝顶部,APC表达水平最高, β -catenin无明显核内聚集表型,Survivin表达水平最低,甚至不表达,这与该区域细胞已经进行终末分化并开凋亡相关,在整个过程中,APC通过抑制 β -catenin的核内聚集,抑制Survivin的表

表 1 有抗癌潜能的Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂

药物	类型	作用机制	治疗干预阶段
Indomethacin	NASID	抑制 β -catenin表达 ^[39,40] 减少Wnt通路靶基因的表达 ^[39]	不同肿瘤实体: II / III 期临床 ^[57]
Sulindac, Sulindac sulfide Sulindac sulfone	NASID, Sulindac代谢产物 Sulindac代谢产物	诱导 β -catenin经蛋白酶体途径降解 ^[41,44] 被PKG磷酸化、诱导 β -catenin经蛋白酶体途径降解、诱导caspase活化 ^[41-43]	不同肿瘤实体: II 期临床 ^[57] FAP; 乳腺癌: III 期临床 ^[53] ; 小细胞肺癌: III 期临床 ^[57] 大肠癌: II 期临床 ^[55, 56]
Aspirin NO-aspirin Celecoxib	NASID NASID 选择性COX-2 抑制剂	使 β -catenin丝/苏氨酸磷酸化而失活 ^[45] 破坏 β -catenin与TCF的相互作用 ^[46] 使 β -catenin重新分布于胞膜上 ^[49]	健康志愿者: 毒性研究、I 期临床 ^[54] FDA批准用于FAP及膀胱癌 ^[57] ; 乳腺癌: III 期临床 ^[57] ; 大肠癌、小细胞肺癌、肝细胞癌: I / II 期临床 ^[57] 大肠癌: III 期临床 ^[57]
Rofecoxib	选择性COX-2 抑制剂	使 β -catenin重新分布于胞膜上 ^[50-52]	大肠癌: III 期临床 ^[57]
Glivec/Gleevec	酪氨酸激酶抑制剂	抑制酪氨酸磷酸化使 β -catenin重新分布于胞膜上 ^[61]	胃肠道间质瘤、慢性髓性白血病: 临床试验 ^[57]
Endostatin	胶原 X V III 内源性片断	诱导 β -catenin经蛋白酶体途径降解 ^[64,65]	不同肿瘤实体: I 期临床 ^[57]
F-box chimera TCF-限制复制型 腺病毒	人工合成蛋白 重组病毒	诱导 β -catenin经蛋白酶体途径降解 ^[69-71] 病毒依赖TCF而复制、融解宿主细胞 ^[67]	体外试验; 动物试验 ^[69-71] 体外试验 ^[67]
TCF-限制复制型 细小病毒	重组病毒	病毒依赖TCF而复制、融解宿主细胞 ^[72]	体外试验 ^[69-71]
依赖TCF而表达 fagg基因的腺病 毒载体	重组病毒	依赖TCF而诱导凋亡 ^[68]	体外试验 ^[68]
PFK115-584	小分子抑制剂; 真菌衍生物	破坏 β -catenin与TCF的相互作用 ^[73]	体外试验 ^[73]
CGP049090	小分子抑制剂; 真菌衍生物	破坏 β -catenin与TCF的相互作用 ^[73]	体外试验 ^[73]

■创新盘点

本文从大肠癌始发和防治策略的角度, 阐述Wnt/ β -catenin通路的重要价值。

达, 使干细胞在向上迁移的过程中通过凋亡而丧失干细胞表型. 如果APC突变, Survivin持续表达, 细胞凋亡受抑制, 突变的干细胞在向肠隐窝顶部迁移的过程中始终维持干细胞样表型, 赋予细胞不死性, 这样就破坏了细胞增殖与分化之间的平衡. 随着多克隆隐窝干细胞数目的激增, 在肠隐窝和肠绒毛的交界处形成了息肉, 随后息肉延伸进入相邻的绒毛内部, 继而填满整个绒毛内空间, 息肉填满相邻几个绒毛后又相互融合. APC突变的直接结果是扩大了肠隐窝的增殖空间, 这导致腺瘤性息肉的形成, 是大肠癌发生的始动环节之一.^[17, 31-33]

4 对Wnt/ β -catenin通路的干预策略

Wnt/ β -catenin信号通路异常是大肠癌发生的基础. 以此通路中的关键成分为靶点, 构成了大肠癌的早期诊断和治疗干预的基础.

4.1 早期诊断 基于APC基因突变产生截短型蛋白这一基础研究, 发展了一项名为PTT(protein truncation test)的检测技术^[34,35], 利用体外转录

和翻译APC基因的基因组PCR产物来预测家族性腺瘤息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)患者及其家族成员罹患癌症的危险性. 而DNA片段的直接测序, 可以确证APC是否发生突变. 大肠癌引发的死亡可通过早期发现大肠腺瘤来避免, 大部分大肠癌在最早期阶段都存在APC功能丧失, 现有的这两种筛查大肠癌的分子生物学方法能检测出APC的突变.

β -catenin的表达与细胞内定位已经用于消化道肿瘤的诊断和预后, 大肠息肉中如果 β -catenin在胞核内染色较强, 那么它恶性进展为腺癌的危险性更大; 大肠肿瘤组织中如果 β -catenin在胞核内染色强, 那么肿瘤生长更富于侵袭性, 术后肿瘤复发率高, 术后生存期短^[36,37]. 此外, 联合检测胃肠道上皮细胞肿瘤标记物CK20(cytokertain 20)与 β -catenin, 还可鉴别诊断大肠肿瘤是原发还是继发^[38].

4.2 以Wnt/ β -catenin通路为靶点的治疗干预 临床研究表明非甾体类抗炎药物(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)不仅能抑制在

■应用要点

Wnt/ β -catenin通路中的APC、 β -catenin作为大肠癌的诊断和治疗的靶点, 有很大的临床应用潜力.

肿瘤组织中高表达的COX-2(cyclooxygenase-2), 而且能抑制Wnt/ β -catenin通路过度激活, 表现出较强的抗癌活性. 例如, 吲哚美辛(indomethacin)能够以剂量依赖性的方式下调 β -catenin的蛋白表达水平, 诱导大肠癌细胞凋亡^[39,40]; 舒林酸(sulindac)及其代谢产物(sulindac sulfide, sulindac sulfone), 可取代失活的APC/GSK-3 β 磷酸化途径, 通过激活蛋白激酶G(protein kinase G, PKG), 诱导 β -catenin磷酸化, 进而通过蛋白酶体途径使磷酸化的 β -catenin降解^[41-43], 下调其靶基因的转录^[44]; 阿司匹林(aspirin)和一氧化氮供体型阿司匹林(nitric oxide-donating aspirin, NO-aspirin)虽然不影响 β -catenin的蛋白表达水平和细胞内定位, 但前者可使 β -catenin特定的丝/苏氨酸磷酸化而处于非转录活化状态, 后者能通过破坏核内 β -catenin/TCF复合体而达到抑制靶基因转录的作用, 而且在抑制大肠癌细胞生长的作用上是前者的2 500-5 000倍^[45-48]; 选择性COX-2抑制剂塞来考昔(celecoxib)和罗非考昔(rofecoxib)可降低细胞核内 β -catenin的水平, 使其重新分布到细胞膜上, 减少相关靶基因的表达^[49-52]. 上述药物的抗癌治疗大都进入了II期或III期临床研究阶段, 塞来考昔还在1999年被美国食品与药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准用于FAP患者, 以减少和抑制其大肠息肉生长^[53-57](表1).

分子靶向药格列卫(Glivec/Gleevec)是一种小分子蛋白酪氨酸激酶抑制剂, 已用于慢性髓性白血病和胃肠道间质瘤的临床治疗^[57]. 由于生长因子介导的酪氨酸磷酸化也能调节 β -catenin的活性^[58-60], 所以 β -catenin也是格列卫的潜在靶标. Zhou *et al*^[61]研究证实格列卫能使 β -catenin重新分布于细胞膜上, 下调 β -catenin的转录活性. 格列卫有望进一步开发为大肠癌的辅助治疗药物(表1).

内皮抑素(endostatin)是血管生成抑制剂, 通过抑制肿瘤血管生成间接发挥抗癌作用^[62]. 最近研究表明^[63-65], 内皮抑素还能促进大肠癌细胞中的 β -catenin经泛素-蛋白酶体途径降解, 并且抑制被 β -catenin过度激活的cyclinD1启动子的活性, 诱导G1期阻滞和细胞凋亡. 已进行的I期临床试验表明, 内皮抑素的抗癌作用局限于Wnt/ β -catenin通路活性较高的大肠癌中^[66](表1).

在治疗策略方面, 除了抑制过度激活的Wnt/ β -catenin通路外, 还能充分利用它异常激活的特性, 杀死大肠癌细胞. Brunori *et al*^[67]构建了一种

重组病毒, 在特定的启动子区域插入TCF结合位点, 利用Wnt/ β -catenin通路过度激活、大量TCF与 β -catenin结合处于活化状态的特性, 选择性激活特定启动子, 启动病毒复制相关基因的转录, 促进病毒复制而融解靶细胞; 而Chen *et al*^[68]在病毒载体中同时插入凋亡诱导基因, 使其在靶细胞中大量表达而诱导细胞凋亡. 这些重组病毒在体外试验中都显示出抑制肿瘤细胞生长的作用(表1).

总之, 大肠癌的形成源于基因组损伤的渐进性累积. 最初的发病基础之一是Wnt/ β -catenin通路的异常激活. 以Wnt/ β -catenin通路中的APC、 β -catenin为靶点, 在大肠癌的诊断和治疗上有巨大的潜力.

5 参考文献

- 1 Morin PJ. β -catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999; 21: 1021-1030
- 2 Kikuchi A. Regulation of β -catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 243-248
- 3 Kemler R, Ozawa M. Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmic anchorage of a Ca^{2+} -dependent cell adhesion molecule. *Bioessays* 1989; 11: 88-91
- 4 Muller T, Choidas A, Reichmann E, Ullrich A. Phosphorylation and free pool of β -catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274: 10173-10183
- 5 Hazan RB, Norton L. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; 273: 9078-9084
- 6 Hiscox S, Jiang WG. Hepatocyte growth factor/scatter factor disrupts epithelial tumour cell-cell adhesion: involvement of β -catenin. *Anticancer Res* 1999; 19: 509-517
- 7 Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 1987; 50: 649-657
- 8 Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; 108: 837-847
- 9 Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of β -catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 2002; 16: 1066-1076
- 10 Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, Polakis P. The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 1999; 9: 207-210
- 11 Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama K, Nakayama K. An F-box protein,

- FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO J* 1999; 18: 2401-2410
- 12 Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination *in vitro*. *Genes Dev* 1999; 13: 270-283
 - 13 Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997; 16: 3797-3804
 - 14 Lee JS, Ishimoto A, Yanagawa S. Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 21464-21470
 - 15 Smalley MJ, Sara E, Paterson H, Naylor S, Cook D, Jayatilake H, Fryer LG, Hutchinson L, Fry MJ, Dale TC. Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J* 1999; 18: 2823-2835.
 - 16 Boutros M, Mihaly J, Bouwmeester T, Mlodzik M. Signaling specificity by Frizzled receptors in *Drosophila*. *Science* 2000; 288: 1825-1828
 - 17 Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-320
 - 18 Kolligs FT, Bommer G, Goke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* 2002; 66: 131-144
 - 19 <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>
 - 20 Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170
 - 21 Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1130-1134
 - 22 Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML. Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59: 1442-1444
 - 23 Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 15-21
 - 24 Smits R, Kielman MF, Breukel C, Zurcher C, Neufeld K, Jagmohan-Changur S, Hofland N, van Dijk J, White R, Edelmann W, Kucherlapati R, Khan PM, Fodde R. Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev* 1999; 13: 1309-1321
 - 25 Tighe A, Johnson VL, Taylor SS. Truncating APC mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability. *J Cell Sci* 2004; 117: 6339-6353
 - 26 Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-1851
 - 27 Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 11-27
 - 28 Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110: 1001-1020
 - 29 Shimomura A, Kohu K, Akiyama T, Senda T. Subcellular localization of the tumor suppressor protein APC in developing cultured neurons. *Neurosci Lett* 2005; 375: 81-86
 - 30 Miyashiro I, Senda T, Matsumine A, Baeg GH, Kuroda T, Shimano T, Miura S, Noda T, Kobayashi S, Monden M. Subcellular localization of the APC protein: immunoelectron microscopic study of the association of the APC protein with catenin. *Oncogene* 1995; 11: 89-96
 - 31 van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002; 111: 241-250
 - 32 Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8664-8667
 - 33 Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 2003; 362: 205-209
 - 34 van der Luijt R, Khan PM, Vasen H, van Leeuwen C, Tops C, Roest P, den Dunnen J, Fodde R. Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test. *Genomics* 1994; 20: 1-4
 - 35 Ballhausen WG. Genetic testing for familial adenomatous polyposis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910: 36-47
 - 36 Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000; 59: 302-309
 - 37 Wong SC, Lo ES, Chan AK, Lee KC, Hsiao WL. Nuclear beta catenin as a potential prognostic and diagnostic marker in patients with colorectal cancer from Hong Kong. *Mol Pathol* 2003; 56: 347-352
 - 38 Wong SC, Lo ES, Lee KC, Chan JK, Hsiao WL. Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1401-1408
 - 39 Smith ML, Hawcroft G, Hull MA. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer* 2000; 36: 664-674
 - 40 Hawcroft G, D'Amico M, Albanese C, Markham AF, Pestell RG, Hull MA. Indomethacin induces differential expression of beta-catenin, gamma-catenin and T-cell factor target genes in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2002; 23: 107-114
 - 41 Rice PL, Kelloff J, Sullivan H, Driggers LJ, Beard KS, Kuwada S, Piazza G, Ahnen DJ. Sulindac metabolites induce caspase- and proteasome-dependent degradation of beta-catenin protein in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 885-892
 - 42 Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D, Pamukcu R. Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* 2000; 60: 3338-3342
 - 43 Liu L, Li H, Underwood T, Lloyd M, David M, Sperl G, Pamukcu R, Thompson WJ. Cyclic GMP-dependent protein kinase activation and induction by exisulind and CP461 in colon tumor cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 583-592
 - 44 Boon EM, Keller JJ, Wormhoudt TA, Giardiello FM, Offerhaus GJ, van der Neut R, Pals ST. Sulindac targets nuclear beta-catenin accumulation and Wnt

■名词解释

CIN(chromosome instability): 染色体不稳定, 如形成非整倍体, 获得或缺失染色体片段。

- signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2004; 90: 224-229
- 45 Dihlmann S, Klein S, Doeberitz Mv MK. Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 509-516
 - 46 Nath N, Kashfi K, Chen J, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin inhibits beta-catenin/T cell factor (TCF) signaling in SW480 colon cancer cells by disrupting the nuclear beta-catenin-TCF association. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12584-12589
 - 47 Williams JL, Borgo S, Hasan I, Castillo E, Traganos F, Rigas B. Nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) alter the kinetics of human colon cancer cell lines more effectively than traditional NSAIDs: implications for colon cancer chemoprevention. *Cancer Res* 2001; 61: 3285-3289
 - 48 Williams JL, Nath N, Chen J, Hundley TR, Gao J, Kopelovich L, Kashfi K, Rigas B. Growth inhibition of human colon cancer cells by nitric oxide (NO)-donating aspirin is associated with cyclooxygenase-2 induction and beta-catenin/T-cell factor signaling, nuclear factor-kappaB, and NO synthase 2 inhibition: implications for chemoprevention. *Cancer Res* 2003; 63: 7613-7618
 - 49 Brown WA, Skinner SA, Vogiagis D, O'Brien PE. Inhibition of beta-catenin translocation in rodent colorectal tumors: a novel explanation for the protective effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2314-2321
 - 50 Evans JF. Rofecoxib (Vioxx), a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, is chemopreventive in a mouse model of colon cancer. *Am J Clin Oncol* 2003; 26: S62-S65
 - 51 Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, Taketo MM, Evans JF. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2001; 61: 1733-1740
 - 52 Yao M, Kargman S, Lam EC, Kelly CR, Zheng Y, Luk P, Kwong E, Evans JF, Wolfe MM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res* 2003; 63: 586-592
 - 53 Griffiths GJ. Exisulind Cell Pathways. *Curr Opin Investig Drugs* 2000; 1: 386-391
 - 54 Fiorucci S, Santucci L, Gresele P, Faccino RM, Del Soldato P, Morelli A. Gastrointestinal safety of NO-aspirin (NCX-4016) in healthy human volunteers: a proof of concept endoscopic study. *Gastroenterology* 2003; 124: 600-607
 - 55 Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F, van Stolk RU. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2003; 348: 891-899
 - 56 Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 883-90
 - 57 <http://www.cancer.gov/clinicaltrials>.
 - 58 Cohen AW, Carbajal JM, Schaeffer RC Jr. VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol* 1999; 277: H2038-H2049
 - 59 Hiscox S, Jiang WG. Association of the HGF/SF receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 406-411
 - 60 Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12103-12108
 - 61 Zhou L, An N, Haydon RC, Zhou Q, Cheng H, Peng Y, Jiang W, Luu HH, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, Breyer B, He TC. Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity. *Cancer Lett* 2003; 193: 161-170
 - 62 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-285
 - 63 Dkhissi F, Lu H, Soria C, Opolon P, Griscelli F, Liu H, Khattar P, Mishal Z, Perricaudet M, Li H. Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 997-1008
 - 64 Hanai J, Gloy J, Karumanchi SA, Kale S, Tang J, Hu G, Chan B, Ramchandran R, Jha V, Sukhatme VP, Sokol S. Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling. *J Cell Biol* 2002; 158: 529-539
 - 65 Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, Albanese C, Waterman M, Chan B, Ramchandran R, Pestell R, Sukhatme VP. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem* 2002; 277: 16464-16469
 - 66 Eder JP Jr, Supko JG, Clark JW, Puchalski TA, Garcia-Carbonero R, Ryan DP, Shulman LN, Proper J, Kirvan M, Rattner B, Connors S, Keogan MT, Janicek MJ, Fogler WE, Schnipper L, Kinchla N, Sidor C, Phillips E, Folkman J, Kufe DW. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3772-3784
 - 67 Brunori M, Malerba M, Kashiwazaki H, Iggo R. Replicating adenoviruses that target tumors with constitutive activation of the wnt signaling pathway. *J Virol* 2001; 75: 2857-2865
 - 68 Chen RH, McCormick F. Selective targeting to the hyperactive beta-catenin/T-cell factor pathway in colon cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4445-4449
 - 69 Su Y, Ishikawa S, Kojima M, Liu B. Eradication of pathogenic beta-catenin by Skp1/Cullin/F box ubiquitination machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12729-12734
 - 70 Cong F, Zhang J, Pao W, Zhou P, Varmus H. A protein knockdown strategy to study the function of beta-catenin in tumorigenesis. *BMC Mol Biol* 2003; 4: 10
 - 71 Liu J, Stevens J, Matsunami N, White RL. Targeted degradation of beta-catenin by chimeric F-box fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 1023-1029
 - 72 Malerba M, Daeffler L, Rommelaere J, Iggo RD. Replicating parvoviruses that target colon cancer cells. *J Virol* 2003; 77: 6683-6691
 - 73 Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW, Shivasani RA. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 2004; 5: 91-102

结直肠癌淋巴管生成与淋巴结转移相关检测的临床研究进展

黄漾, 张国锋

黄漾, 张国锋, 同济大学附属同济医院普通外科 上海 200065
同济大学医科基金, No. 1508219021
通讯作者: 黄漾, 200092, 同济大学200282信箱, 上海市杨浦区四平路1239号, rose-hy17@126.com
电话: 021-65981254
收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

摘要

结直肠癌是人类常见的可经淋巴道转移的恶性肿瘤, 其淋巴管生成与转移过程中牵涉了多种生物标志物表达水平的改变, 检测这些相关生物标志物可为结直肠癌的诊断、治疗和预后情况提供重大参考价值。本文主要综述近年来与结直肠癌淋巴管生成与淋巴结转移相关检测的临床研究进展。

关键词: 结直肠癌, 淋巴管生成, 淋巴结转移, 标记物

黄漾, 张国锋. 结直肠癌淋巴管生成与淋巴结转移相关检测的临床研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(2):207-211
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/207.asp>

0 引言

结直肠癌是人类常见的可经淋巴道转移的恶性肿瘤, 其转移过程包括肿瘤离开原发灶, 侵袭进入淋巴系统并转移至区域淋巴结。哨兵淋巴结的活检术为肿瘤细胞经毛细淋巴管和淋巴管从肿瘤原发灶向区域淋巴结的有序演进过程提供了解剖学证据; 依靠分子技术确定的多种淋巴管内皮细胞的特异性标志物, 使得科学家们可以对肿瘤旁和肿瘤内的淋巴管进行测定和计数; 针对多种与结直肠癌淋巴管生成和转移相关的生物标志物的多项研究成果, 更是为结直肠癌的诊断、治疗和预后提供了重大的参考价值。本文就结直肠癌淋巴管生成与转移的检测综述相关临床研究进展, 揭示这些生物标志物在结直肠癌的淋巴管生成与转移过程中的意义和价值。

1 淋巴管生成与转移的关系

传统观点认为肿瘤的淋巴道转移是一个被动过程。在此过程中, 肿瘤细胞通过业已存在的局部

淋巴管转移至区域淋巴结, 所以淋巴管内皮细胞在肿瘤的转移过程中扮演着被动角色^[1]。然而近年来的研究发现: 淋巴管生成在肿瘤转移中的作用机制日渐明朗, 揭示出其主动性介导肿瘤转移的作用而非被动^[2]。淋巴管生成是新生淋巴管的形成和生长, 他可以发生于正常发育的组织, 也可以出现在病理过程中如炎症、战伤、淋巴水肿和肿瘤。由于肿瘤早期常发生淋巴结的转移, 这提示了淋巴管在肿瘤的转移过程中起着重要作用。

目前研究确定了多种可以识别新生淋巴管的标志物, 如: 转录因子Prox-01, Podoplanin, LYVE-1和VEGFR-3(即Flt-4)等; 并探索出多种淋巴管生成的信号转导途径, 如: VEGF-C、VEGF-D/VEGFR-3途径, VEGF-A/VEGFR-2途径, PDGF-BB途径和FGF-2途径等。这些深入到分子学领域的研究成果为科学家们揭开肿瘤淋巴管生成的奥秘开辟了可行之路。

对VEGF-A介导的肿瘤转移的研究表明, 原发肿瘤可能通过分泌淋巴管生成因子来介导其向哨兵淋巴结的有效转移, 从而为肿瘤的转移作准备^[3]。在皮肤黑素瘤患者中也发现, 肿瘤的淋巴管生成可以预测原发肿瘤向哨兵淋巴结的转移^[4]。所以人们推断淋巴管生成与局部淋巴结转移机会的增加相关, 他可能是肿瘤转移过程中的关键步骤。

2 与大肠癌淋巴管生成与转移相关的检测指标

2.1 VEGFs(vascular endothelial growth factors)

VEGFs包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、和PIGF(placenta growth factor)。VEGF-A的受体为VEGFR-1(Flt-1)和VEGFR-2(KDR), VEGF-B和PIGF的受体为VEGFR-1(Flt-1), VEGF-C和VEGF-D的受体为VEGFR-2(KDR)和VEGFR-3(Flt-4)。传统观点认为VEGF-A、VEGF-B、VEGF-E和PIGF影响和控制着脉管的渗透性和血管生成; 而

■背景资料

结直肠癌是人类常见的可经血行和淋巴道转移的恶性肿瘤。目前, 其血行转移的机制已被研究得比较透彻; 而其淋巴管生成与转移也逐渐成为该领域新的研究热点。在结直肠癌的淋巴管生成与转移的过程中牵涉了多种生物标志物表达水平的改变, 检测这些相关生物标志物可为结直肠癌的诊断、治疗和预后情况提供重大参考价值。本文主要综述近年来与结直肠癌淋巴管生成与淋巴结转移相关检测的最新的临床研究进展。

■ 相关报道

- 1 Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005; 201: 1089-1099
- 2 Xiong B, Sun TJ, Hu WD, Cheng FL, Mao M, Zhou YF. Expression of oxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1105-1108
- 3 Kong SL, Salto-Tellez M, Leong AP, Chan YH, Koay ES. Discordant quantitative detection of putative biomarkers in nodal micro-metastases of colorectal cancer: biological and clinical implications. *J Clin Pathol* 2005; 58: 839-844

VEGF-C和VEGF-D 既可与VEGFR-2 结合介导血管生长, 又可与VEGFR-3 结合介导淋巴管生长. 但近年来有研究表明VEGF-A 可以直接通过作用于淋巴内皮细胞上的VEGFR-2 和间接通过VEGF-C或VEGF-D来介导淋巴管生成, 且后者更合理^[5]. VEGF-A 还可以介导肿瘤和哨兵淋巴结的淋巴管生成来促进肿瘤的淋巴道转移^[3].

Boxer *et al*^[6]用免疫组化法检测无淋巴结转移的结直肠癌标本中VEGF的表达水平, 研究发现VEGF阳性与患者死亡率显著相关. 已发生转移的结直肠癌中, George *et al*^[7]用半定量RT-PCR检测VEGF-A、VEGF-C和VEGF-D, 结果显示: VEGF-A和VEGF-C在结直肠癌中表达显著增高, 而VEGF-D的表达下降. Kawakami *et al*^[8]对VEGFs之间关系的研究中发现, VEGF-B和VEGF-E的高表达以及VEGF-D的低表达与淋巴道转移相关. 这些均提示VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C与VEGF-D之间的平衡可能在结直肠癌的淋巴管生成及转移过程中起着一定作用. VEGF-A的表达水平在有淋巴结转移的结直肠癌组织中显著高于没有转移的癌组织^[7], 提示VEGF-A和VEGF-C的表达增加与区域淋巴结转移显著相关. Onogawa *et al*^[9]的实验表明, VEGF-C与VEGF-D表达均与结直肠癌淋巴结转移相关, 但两者在肿瘤中表达未见相关性, 提示VEGF-C和VEGF-D可能是结直肠癌重要的独立预后因子.

2.2 抑癌基因p53和p16

2.2.1 p53基因 结直肠癌侵袭过程中涉及多种抑癌基因的异常改变, p53就是其中之一. p53有野生型和突变型两种. 野生型P53基因表达蛋白具有监视细胞基因组完整性的功能. 当DNA出现缺陷时, 他可通过特定机制对其进行修复, 如修复失败, 则通过诱导细胞凋亡的途径将该细胞清除, 从而阻止具有癌变倾向的细胞在体内存留. 突变型P53蛋白在细胞内积聚则促进细胞转化和增殖, 导致肿瘤的发生. Gouw *et al*^[10]研究发现, 已转移的结直肠癌中突变型p53的表达率为36%, 且在结直肠癌肝转移时表达率更高, 这进一步证实了p53基因突变在结直肠癌的发生发展中具有重要意义, 也提示可以通过检测P53蛋白作为结直肠癌早期诊断的一项重要参考指标. Hsieh *et al*的研究表明, 检测血浆中P53蛋白可发现该基因的突变并提示肿瘤转移的高度可能性, 血浆中P53蛋白与结直肠癌的淋巴结转移和TNM分期密切相关. 另外, 结直肠癌的术后转移

和复发率在P53蛋白阳性组显著高于P53蛋白阴性组. 已发生腹膜转移的结直肠癌中也常可检测到突变型的p53基因^[11], 这些均提示p53基因突变可用于判断患者预后情况, 有p53突变的肿瘤预后较差.

2.2.2 p16基因 p16基因是近年发现的一种抑癌基因, 又称为多种肿瘤抑制因子 (MTS₁) 或CDKN₂基因, 许多恶性肿瘤都存在p16基因结构和功能的异常变化. p16主要功能是通过抑制CDK₄(细胞周期素蛋白依赖性激酶4) 而阻止细胞由G1期进入S期, 使细胞增殖受限, 因此对正常细胞的生长周期起负调控作用. 当p16基因异常时, 失去对细胞生长的负调控作用, 使G1期细胞迅速进入S期, 细胞过度增殖从而导致肿瘤发生发展. Kim *et al*^[12]对结直肠癌的RT-MSP显示, 结直肠癌组织中p16异常甲基化程度各异. 高甲基化的癌组织中p16的表达水平显著低于无甲基化或低甲基化的癌组织. p16的低水平表达与淋巴结转移和肿瘤的大小相关. 这表明在结直肠癌组织中存在明显的p16表达的缺失, 因此p16失活可能与结直肠癌发生有关, p16低表达可促使有转化潜能的细胞分裂增殖, 并进入癌前状态, 并随p16缺失程度的增加, 结直肠癌的恶性程度也增加. Cui *et al*^[13]关于结直肠癌的研究表明p16基因异常表达组的术后生存率低于p16表达正常组. 所以可以通过检测P16蛋白产物表达作为结直肠癌早期诊断及判断其恶性程度的依据之一.

总之, 检测结直肠癌中p53和p16的表达水平对结直肠癌早期诊断, 判断恶性程度及预后情况有一定意义.

2.3 COX-2 COX是前列腺素生物合成过程中的一种限速酶. 他有COX-1和COX-2两种形式, COX-1在正常细胞中呈组成性表达, 参与细胞的生理功能; 而COX-2是一种可诱导的酶, 在各种刺激 (如生长因子和有丝分裂原) 的作用下被诱导表达. COX-2在许多肿瘤中的表达也增加: 如肺癌、乳腺癌、食管癌和结直肠癌等. COX-2的过度表达导致表型的改变, 如增加与细胞外基质的黏附和阻断大鼠肠上皮细胞的凋亡, 从而提高细胞癌变的潜能. COX-2的组成性表达也可导致结直肠癌细胞浸润能力的改变. 虽然他在结直肠癌中的具体作用还不清楚, 但COX-2可能参与了肿瘤的血管生成.

Xiong *et al*^[14]对结直肠癌COX-2表达的研究表明, 结直肠癌患者的COX-2阳性表达为67.9%. T3-T4, III-IV期以及发生转移的结直肠癌患者的

COX-2表达水平明显高于T1-T2, I-II期以及没有转移的患者. VEGF和MMP-2在COX-2阳性组的表达水平明显高于COX-2阴性组, 这说明在结直肠癌中, COX-2的表达与VEGF和MMP-2表达相关, COX-2可能既通过上调VEGF, 间接的促进肿瘤血管生成, 他又可以通过上调MMP-2而导致结直肠癌细胞侵袭能力的改变. von Rahden *et al*^[15]对食管腺癌的研究发现, COX-1和COX-2与VEGF-A和VEGF-C的表达相关, 从而与肿瘤的血管生成 (VEGF-A) 和淋巴生成相关 (VEGF-C). 所以说, COX-2与结直肠癌的浸润和转移密切相关, 可以作为结直肠癌的一种生物标志物.

2.4 TGF- β (transforming growth factor beta) TGF- β 作为一种细胞因子, 有多种功能: 抑制生长, 促进凋亡和肠上皮细胞的分化等. 通常TGF- β 阻碍正常的肠上皮细胞的生长; 但也可以转化为肿瘤生长演进的促进因子, 从而提高肿瘤的恶性转化. Guzinska-Ustymowicz *et al*^[16]研究发现许多肿瘤细胞 (包括结直肠癌) 能分泌TGF- β , 结直肠癌中TGF- β 的高表达增加了肿瘤转移的可能性, TGF- β 在PT1结直肠癌有淋巴结和远处转移的组织中表达量更高. 由于TGF- β 在PT1结直肠癌的表达水平与TB(Tumor-Budding), 血管生成以及淋巴结和远处转移密切相关, 所以TGF- β 可以与肿瘤组织学的其他参数联合, 作为评估PT1结直肠癌侵袭性的参数.

2.5 PINCH(particularly interesting new cysteine-histidine-rich protein) PINCH是带有LIM结构域的接合器蛋白, 他在整合素和生长因子的信号传导通路中起着一定作用. Wang-Rodriguez *et al*^[17]研究发现PINCH在与许多常见肿瘤 (如结直肠癌、肝癌等) 相关的间质中的表达上调, Gao *et al*^[18]研究也发现结直肠癌患者的癌组织间质中PINCH表达量按正常黏膜-原发肿瘤-肿瘤转移灶的顺序增加, 并且PINCH在浸润性肿瘤周边的染色强度比肿瘤内部的间质中更高. 在成纤维细胞、肌成纤维细胞以及肿瘤的部分血管内皮细胞中也发现有PINCH的表达. 这提示PINCH参与了肿瘤与间质的相互作用以及肿瘤的演进过程. PINCH间质染色强阳性与预后不良和分化较好相关^[18], 然而由于分化较好的肿瘤通常预后较好, 故PINCH染色强阳性也可增加确诊那些肿瘤分化良好但预后不佳的结直肠癌患者的可能性.

2.6 与结直肠癌淋巴结微转移相关的生物标志

物 深入分子学水平的检测指标提高了结直肠癌淋巴结微转移的检出率, 将改善那些尚未出现淋巴结转移的结直肠癌患者的预后情况.

2.6.1 CK(cytokeratin)和CEA(carcinoembryonic antigen) 研究发现RT-PCR法测定外周血中的CK20-mRNA^[19], RT-PCR法测定CEA^[20]及联合检测淋巴结中CK和CEA^[21]可以提高DukesB期结直肠癌患者淋巴结微转移的检出率, 有助于发现微小转移的癌细胞, 对治疗方案的选择及判断预后具有指导意义.

2.6.2 HLTF、SOCS-1和CDH13 Hibi *et al*^[22]微转移研究表明结直肠癌淋巴结转移阴性的患者, 其HLTF、SOCS-1和CDH13基因常出现异常的甲基化, 检测这些基因将提高结直肠癌淋巴结转移的检出率.

2.7 其他

2.7.1 MCs(mast cell)和TAMs(tumor associated macrophage) 肿瘤中发现有一些浸润的免疫监视细胞, 包括MCs和TAMs. 他们可以反映机体针对肿瘤的免疫反应.

TAMs有介导肿瘤的细胞毒作用和刺激抗肿瘤的淋巴细胞增殖的潜能. Tan *et al*^[23]的研究表明TAMs可以抑制结直肠癌的演进以及区域淋巴结转移和肿瘤的远处转移, 而且TAMs的高度浸润可以影响结直肠癌患者的预后情况. 因此, TAMs浸润可能预示着机体的抗肿瘤能力.

Grizzi *et al*^[24]的研究表明, MCs与肿瘤的血管生成相关, MCs可分泌VEGF, 介导肿瘤的血管生成, 所以MCs可能有促进肿瘤生长的作用. Poonkhum *et al*^[25]最新的研究发现, 肝的淋巴淤滞所导致的肝小叶下间隙中MCs和浆细胞的聚集可能参与了淋巴管生成.

Tan *et al*^[23]的研究还发现, TAMs和MCs的联合作用对于抗肿瘤的免疫反应是很重要的. 所以在检测中若能联合MCs和TAMs计数这两项指标, 对于评估结直肠癌的生物学特性更有帮助.

2.7.2 TB(tumor budding) 与结直肠癌侵袭性相关的异常的组织病理学参数称为TB. 早期的研究发现TB是结直肠癌的一种潜在预后因子^[26]. 近年来Guzinska-Ustymowicz *et al*^[27]研究发现TB的强度与结直肠癌淋巴结转移相关. Guzinska-Ustymowicz *et al*^[16]统计分析表明TB和结直肠癌的组织学分型、淋巴结转移、远处转移以及术后肿瘤的复发相关. 所以TB可以结合其他的影响因子, 用于结直肠癌预后情况的辅助评估.

2.7.3 TEMs(tumor endothelial markers) TEMs是新发现的与肿瘤特异性血管生成相关的内皮细胞标志物家族. Rmali *et al*^[28]最新研究表明TEM-1、TEM-7、TEM-7R和TEM-8的表达水平与淋巴结转移和疾病的演进情况相关, 所以他们在结直肠癌中可能有预后价值.

2.7.4 CXCR4 CXCR4是趋化因子受体, 他与肿瘤的转移相关, 预后不良. Schimanski *et al*^[29]研究表明结直肠癌组织CXCR4的高表达与淋巴结和远处转移相关.

2.7.5 Actinin-4 Actinin-4是肌动蛋白的结合蛋白, 他是反映肿瘤侵袭性的新型生物标志物. Honda *et al*^[30]最新研究表明Actinin-4可以增加细胞的移动性, 促进结直肠癌的淋巴结转移.

总之, 随着结直肠癌淋巴管生成与转移机制的研究深入以及检测手段的高新尖化, 结直肠癌淋巴管生成与转移相关的检测也由细胞水平进入分子水平. 近年来的大量研究发现了与结直肠癌淋巴管生成与转移相关的大量生物标志物, 为结直肠癌患者的早期诊断、治疗方法的选择和预后情况的评估提供了重要依据和重大意义. 同时, 由于其中大部分的生物标志物的特异性及敏感性不高, 从而降低了他们在临床应用中的价值. 故大力发展相关的基础和临床研究, 发现特异性及敏感性较高的生物标志物或取长补短联合多种标志物以提高其临床应用价值是当前科学家们努力的方向, 具有广阔的临床应用前景.

3 参考文献

- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257
- Dadras SS, Detmar M. Angiogenesis and lymphangiogenesis of skin cancers. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004; 18: 1059-1070
- Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005; 201: 1089-1099
- Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, Jahnke K, Hauschild A, Hirakawa S, Mihm MC, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol* 2005; 18: 1232-1242
- Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002; 196: 1497-1506
- Boxer GM, Tsiompanou E, Levine T, Watson R, Begent RH. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer. *Tumour Biol* 2005; 26: 1-8
- George ML, Tutton MG, Janssen F, Arnaout A, Abulafi AM, Eccles SA, Swift RL. VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001; 3: 420-427
- Kawakami M, Furuhashi T, Kimura Y, Yamaguchi K, Hata F, Sasaki K, Hirata K. Expression analysis of vascular endothelial growth factors and their relationships to lymph node metastasis in human colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22: 229-237
- Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Kimura S, Chayama K. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2004; 95: 32-39
- de Jong KP, Gouw AS, Peeters PM, Bulthuis M, Menkema L, Porte RJ, Slooff MJ, van Goor H, van den Berg A. P53 mutation analysis of colorectal liver metastases: relation to actual survival, angiogenic status, and p53 overexpression. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4067-4073
- Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ, Huang YS, Huang CJ, Wang JY. APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *Am Surg* 2005; 71: 336-343
- Kim BN, Yamamoto H, Ikeda K, Damdinsuren B, Sugita Y, Ngan CY, Fujie Y, Ogawa M, Hata T, Ikeda M, Ohue M, Sekimoto M, Monden T, Matsura N, Monden M. Methylation and expression of p16INK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues. *Int J Oncol* 2005; 26: 1217-1226
- Cui X, Shirai Y, Wakai T, Yokoyama N, Hirano S, Hatakeyama K. Aberrant expression of pRb and p16(INK4), alone or in combination, indicates poor outcome after resection in patients with colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2004; 35: 1189-1195
- Xiong B, Sun TJ, Hu WD, Cheng FL, Mao M, Zhou YF. Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1105-1108
- Von Rahden BH, Stein HJ, Puhlinger F, Koch I, Langer R, Piontek G, Siewert JR, Hofler H, Sarbia M. Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 5038-5044
- Guzinska-Ustymowicz K, Kemon A. Transforming growth factor beta can be a parameter of aggressiveness of pT1 colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1193-1195
- Wang-Rodriguez J, Dreilinger AD, Alsharabi GM, Rearden A. The signaling adapter protein PINCH is upregulated in the stroma of common cancers, notably at invasive edges. *Cancer* 2002; 95: 1387-1395
- Gao J, Arbman G, Rearden A, Sun XF. Stromal staining for PINCH is an independent prognostic indicator in colorectal cancer. *Neoplasia* 2004; 6: 796-801
- Guo J, Xiao B, Jin Z, Qin L, Chen J, Chen H, Zhang X, Liu Z. Detection of cytokeratin 20 mRNA in the peripheral blood of patients with colorectal cancer by immunomagnetic bead enrichment and real-time

- reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1279-1284
- 20 Takayama O, Yamamoto H, Ikeda K, Ishida H, Kato T, Okuyama M, Kanou T, Fukunaga M, Tominaga S, Morita S, Fujie Y, Fukunaga H, Ikenaga M, Ikeda M, Ohue M, Sekimoto M, Kikkawa N, Monden M. Application of RT-PCR to clinical diagnosis of micrometastasis of colorectal cancer: A translational research study. *Int J Oncol* 2004; 25: 597-604
- 21 Kong SL, Salto-Tellez M, Leong AP, Chan YH, Koay ES. Discordant quantitative detection of putative biomarkers in nodal micrometastases of colorectal cancer: biological and clinical implications. *J Clin Pathol* 2005; 58: 839-844
- 22 Hibi K, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A. Aberrant methylation of HLTF, SOCS-1, and CDH13 genes is shown in colorectal cancers without lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1282-1286
- 23 Tan SY, Fan Y, Luo HS, Shen ZX, Guo Y, Zhao LJ. Prognostic significance of cell infiltrations of immunosurveillance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1210-1214
- 24 Grizzi F, Franceschini B, Chiriva-Internati M, Liu Y, Hermonat PL, Dioguardi N. Mast cells and human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1469-1473
- 25 Poonkhum R, Pisetpaisan K, Wang BJ, Anupunpisit V, Ohtani Y, Ohtani O. Origins and pathways of fluid entering sublobular lymphatic vessels in cat livers. *Arch Histol Cytol* 2003; 66: 317-326
- 26 Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor budding in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 627-635
- 27 Guzinska-Ustymowicz K, Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S. Tumor budding and its relationship to p53 and Bcl-2 expression in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 649-654
- 28 Rmali KA, Puntis MC, Jiang WG. Prognostic values of tumor endothelial markers in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1283-1286
- 29 Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, Jayasinghe C, Gonner U, Wilsberg V, Junginger T, Berger MR, Galle PR, Moehler M. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1743-1750
- 30 Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Sato S, Hasegawa F, Ino Y, Ono M, Hirohashi S. Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 128: 51-62

电编 张勇 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

《现代消化及介入诊疗》杂志征稿、征订启事

本刊讯 《现代消化及介入诊疗》(Modern Digestion & Intervention)是国家科技部批准、广东省卫生厅主管、广东省医学会主办、南方医科大学南方医院消化病研究所承办向国内外公开发行的学术性医学期刊。

本刊宗旨是贯彻邓小平理论和“三个代表”思想,报道现代消化病与介入诊疗学的理论研究和临床经验,展示科技成果,加强学术交流,促进科技繁荣。遵循“三主三结合”原则:①以临床应用为主,基础理论与临床实践相结合;②以普及新技术新业务为主,普及与提高相结合;③以现代医学为主,中医与西医相结合,及时传递最新学术信息,刊载优秀论文、专题笔谈和专家读片,突出科学性、先进性和实用性,推动消化病与介入诊疗工作的开展与提高,为人类健康服务。本刊开设栏目有述评、专家论坛、论著(基础与临床)、短篇论著、综述、临床交流、诊疗技术、讲座、会议纪要、学术争鸣、病例分析与个案报道,欢迎投稿,欢迎订阅,请直接与编辑部联系。

本刊为大16开季刊,国内统一刊号: CN44-1580/R, 国际标准刊号: ISSN1672-2159, 广告经营许可证号: 4400004001080, 每期定价12元, 全年48元。地址: 广州市广州大道北1838号南方医科大学南方医院消化编辑部(邮编: 510515)。联系电话: 020-61641547, 传真: 020-87280770, E-mail: jmdi@vip.163.com。

TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu、Arg677Trp多态性与中国湖北汉族炎症性肠病无相关性

熊利芬, 夏冰, 姜黎, 郭秋莎, 孙泽群

■背景资料

炎症性肠病(IBD)是病因不明慢性肠道炎症性疾病,临床上分为克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)二种类型。IBD具有遗传易感性。Toll命名来源于果蝇的一个具有先天性抗感染作用的受体蛋白,TLR超家族有近10个成员已被鉴定出来,其中TLR4和TLR2研究最深入。近来研究显示TLR4是细菌LPS的受体,具有宿主防御革兰氏阴性菌感染作用。TLR2具有防御革兰氏阳性菌、分枝杆菌、真菌感染的作用。

熊利芬, 夏冰, 姜黎, 郭秋莎, 孙泽群, 武汉大学中南医院内科消化系病研究中心 武汉大学医学院过敏与免疫疾病重点实验室 湖北省武汉市 430071
湖北省卫生厅科研基金重点项目, No. JX1A14
通讯作者: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市武昌东湖路169号, 武汉大学中南医院内科. bingxia2004@yahoo.com.cn
电话: 027-67812985
收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-11-24

No association of TLR4 gene Asp299Gly, TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp polymorphisms with inflammatory bowel disease in Chinese Han population of Hubei province

Li-Fen Xiong, Bing Xia, Li Jiang, Qiu-Sha Guo, Ze-Qun Sun

Li-Fen Xiong, Bing Xia, Li Jiang, Qiu-Sha Guo, Ze-Qun Sun, Department of Internal Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Research Center of Digestive Diseases, Laboratory of Allergy and Immune-related Diseases, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Supported by the Key Science Research Foundation of Health Department of Hubei Province, No. JX1A14
Correspondence to: Bing Xia, Department of Internal Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Street, Wuhan 430071, Hubei Province, China. bingxia2004@yahoo.com.cn
Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To explore the distribution of Toll-like receptor 4 (TLR4) gene Asp299Gly, and TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp polymorphisms in inflammatory bowel disease (IBD) in Chinese Han patients of Hubei province.

METHODS: The polymorphisms of TLR4 gene Asp299Gly, and TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp were genotyped in 120 patients with IBD and 110 healthy controls by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. The association between the polymorphism and IBD as well as its clinical pheno-

type was analyzed.

RESULTS: The mutant genotypes of the TLR4 gene Asp299Gly, TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp were not found in both the IBD patients and healthy controls.

CONCLUSION: TLR4 gene Asp299Gly and TLR2 gene Arg753Glu, Arg677Trp polymorphisms are not associated with IBD in Chinese Han patients of Hubei province.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Toll like receptor 4; Toll-like receptor 2; Gene polymorphism

Xiong LF, Xia B, Jiang L, Guo QS, Sun ZQ. No association of TLR4 gene Asp299Gly, TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp polymorphisms with inflammatory bowel disease in Chinese Han population of Hubei province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):212-215

摘要

目的: 研究TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp多态性在中国汉族人群中的分布,探讨其与炎症性肠病的相关性。

方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法,检测120例中国湖北汉族炎症性肠病患者与110例正常对照者TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp基因型,分析该基因多态性与炎症性肠病以及临床亚型的相关性。

结果: 炎症性肠病患者和健康对照者均未检测出TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp突变型。

结论: TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp基因多态性与中国湖北汉族人群炎症性肠病的易感性无相关性。

关键词: 炎症性肠病; Toll样受体4; Toll样受体2; 基因多态性

熊利芬, 夏冰, 姜黎, 郭秋莎, 孙泽群. TLR4基因Asp299Gly及

■研究前沿

目前对IBD的免疫遗传学机制是研究热点,微生物与IBD的关系也已引起人们的重视。对于TLR基因的研究主要集中于TLR2和TLR4的功能。

TLR2基因Arg753Glu、Arg677Trp多态性与中国湖北汉族炎症性肠病无相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(2):212-215
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/212.asp>

0 引言

Toll样受体(toll-like receptor, TLR)作为革兰氏阴性菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的受体, 其基因第四外显子Asp299Gly的突变, 可改变TLR4的细胞外结构, 导致对革兰阴性菌的LPS无反应或LPS信号途径抑制. 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是涉及多基因的肠黏膜免疫性疾病, 在正常情况下几乎无法在肠黏膜表面检测到TLR4, 但在IBD的肠上皮表面却可检测到TLR4的表达呈显著上调^[1]. 研究发现, LPS可促进结肠癌细胞株的生长, 具有促癌作用^[2], 提示TLR4在IBD和大肠癌发病机制中可能具有一定的功能. TLR2基因Arg753Glu多态性在白人中出现频率1%-4%, 明显高于亚洲人(尚未见阳性报道), 而且与感染性疾病的关系引人注目, 尤其是带有TLR2激动剂的有机体, 如革兰阳性菌、分枝杆菌和螺旋体等^[3]. TLR2基因Arg677Trp多态性在瘤型麻风患者中已经检出突变型^[4]. 研究发现, 把带有TLR2 Arg753Glu和Arg677Trp突变基因嵌入编码TLR2基因的表达载体中, 会减低中国仓鼠卵巢细胞对合成脂肽刺激的反应^[5]. 因此, 小鼠TLR2突变导致TLR2信号途径明显抑制, 机体对上述细菌感染的易感性增强. NOD2/CARD15是克罗恩病(CD)的第一个易感基因, Netea *et al*^[6]研究表明, NOD2基因3 020位点插入移码突变与CD相关的机制是细胞受到TLR2配体、肽聚糖或者Pam3Cys-KKK等刺激后血单核细胞释放IL-10, 而不是由于TLR4配体LPS刺激所致, 表明NOD2是PGN的受体而不是LPS. TLR的功能与NOD2类似, 与先天性免疫有关. 然而, 目前未见TLR2基因多态性与炎症性肠病(IBD)的相关性报道. 在人类, 肠腔内存在大量的微生物, 但在正常情况下肠黏膜上皮细胞(IEC)对绝大多数TLR2配体无应答. IEC上TLR2蛋白表达相对缺乏, 而Toll抑制蛋白高表达对于阻止由于肠腔内共生革兰氏阳性菌诱导慢性炎症因子的释放有重要作用. 我们假设TLR基因变异的个体, 肠黏膜先天性免疫细胞和肠上皮TLR分子结构改变, 使机体的先天性免疫系统不能正常处理肠腔内的大量的细菌微生物. 肠黏膜在大量的革兰阳性菌的长期刺激下, 易产生感染和炎症、过敏和易激, 甚至癌变. 因

此, 作为粗筛, 我们研究TLR4和TLR2基因多态性与IBD的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2001/2004在武汉大学中南医院以及武汉市其他大型医院就诊的湖北汉族无亲缘关系的IBD患者120例, 其中溃疡性结肠炎(UC)104例, CD16例. UC及CD诊断标准参照中华医学会消化病学分会2001年对IBD诊断治疗规范的建议^[7]. 此外, 收集参加正常体检的健康对照者110例, 在年龄与性别上相匹配.

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 采血5 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 常规蛋白酶K消化, 苯酚/氯仿提取. 提取的DNA溶解于TE中, -25℃保存.

1.2.2 PCR扩增 TLR4: 在25 μL的反应体系中分别加入引物. (引物设计参照文献[8]F1、R1(F1-5'TTAGAAATGAAGGAACTTGGAAGG3, R1-5'TTTGTCAAACAATTAATAAGTGATTAATA3)和F2、R2(F2-5'AGCATACTTAGACTACCACCTCGATG3', R2-5'GTTGCCATCCGAAATTATAGAAAAG3'). 94℃预变性3 min. 94℃变性45 s; 51℃退火45 s; 72℃延伸45 s; 共38次循环. 最后72℃彻底延伸5 min. TLR2: 在25 μL的反应体系中分别加入引物(引物设计参照文献[9], F1、R1(F1: 5'-GCCTACTGGGTGGAGAACCCT-3', R1: 5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3'). 95℃预变性5 min. 95℃变性40 s; 58℃退火50 s; 72℃延伸60 s; 共30次循环. 最后72℃彻底延伸5 min. PCR产物于20 g/L琼脂糖凝胶电泳并在紫外分析仪下分析鉴定.

1.2.3 PCR限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP) TLR4: 将两组PCR产物各取10 μL, 分别用*Bsa*B I及*Bsa*X I两种限制性内切酶消化. 前者于55℃酶切4 h后于65℃灭活20 min, 后者于65℃酶切4 h后于80℃灭活20 min. 前者的PCR产物为139 bp, 当Asp299Gly多态性位点为A(腺嘌呤, 野生型)时, 可被*Bsa*B I酶切为112 bp和27 bp. 后者的PCR产物为131 bp, 当Asp299Gly多态性位点为G(鸟嘌呤, 突变型)时, 可被*Bsa*X I酶切为108 bp和23 bp. 酶切产物均以80 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V, 1.5 h)分离、硝酸银染色. TLR2: 取5 μL PCR产物, 用*Aci*I限制性内切酶消化. 于37℃酶切2 h后于65℃灭活20 min. PCR产物为340 bp, 当TLR2基因为野生型(TLRwt)时, 可被*Aci*I酶切为三个片段:

■创新盘点

本文研究了TLR4基因Asp299Gly多态性及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp多态性与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性, 此前尚无中国人人群TLR2基因多态性报道及其与IBD的关系研究.

■应用要点

本文将TLR2基因研究与IBD联系起来,研究TLR2基因突变与IBD的相关性,为阐明IBD的遗传易感性和先天性免疫机制提供依据,具有重要的科学意义和临床价值。

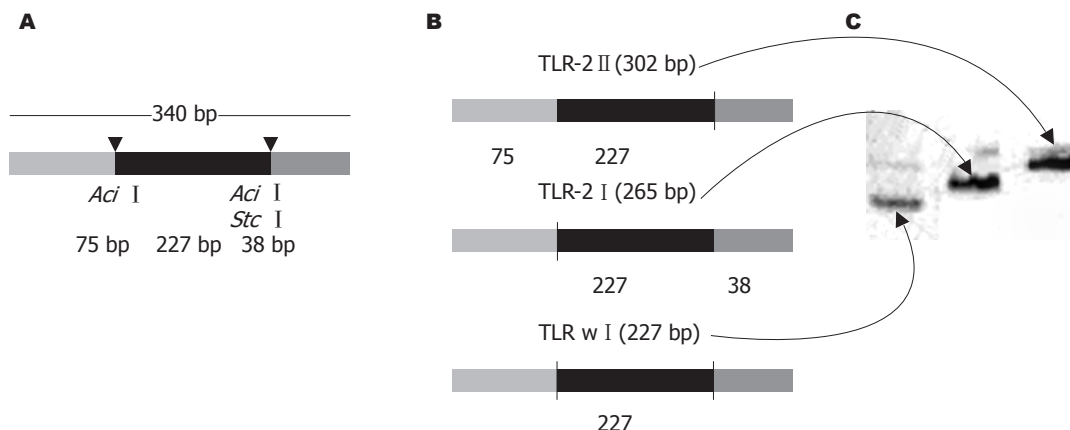


图1 TLR2基因多态性RFLP基本原理. 设计的引物跨越两种多态性, PCR产物为340 bp, 箭头所指为限制性内切酶 Aci I 切割位点, 用 Aci I 消化产生302 bp (TLR2- II), 265 bp (TLR2- I), 或者227 bp (野生型)。

75 bp, 227 bp, 38 bp; 当TLR2基因为Arg753Glu突变(TLR2 I)时, 可被 Aci I 酶切为二个片段: 265 bp, 75 bp; 当TLR2基因为Arg677Trp(TLR2 II)突变时, 可被 Aci I 酶切为二个片段: 302 bp, 38 bp. 酶切产物均以80 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V, 3 h)分离、硝酸银染色(图1)^[9].

统计学处理 通过SPSS 11.5软件包进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

对230份DNA样本进行基因分析, 均未发现TLR4 Asp299Gly和TLR2基因Arg753Glu, Arg677Trp位点的突变. 所有DNA样本139 bp的PCR产物均可被 Bsa B I 酶切为112 bp和27 bp两个片段, 而131 bp的PCR产物均不能被 Bsa X I 酶切为108 bp和23 bp. 即在全部检测样本中TLR4基因Asp299Gly多态性位点均为野生型A, 未见突变型G. 所有DNA样本340 bp的PCR产物均可被 Aci I 酶切为75 bp, 227 bp, 38 bp三个片段. 既在全部检测样本中, TLR2基因Arg753Glu多态性位点均为野生型A, 未见突变型G. Arg677Trp多态性位点也均为野生型A, 未见突变型T.

3 讨论

TLR4参与先天性免疫应答的激活, 还诱导共刺激分子CD80表达, 为获得性免疫的启动提供必要的活化信号. TLR4通过协同分子CD14、LPS结合蛋白(LPS inbinding protein, LBP)的共同作用, 将LPS传导通路的信号迅速传至核内, 激活NF- κ B及相关细胞因子的表达. TLR4基因的非同义单核苷酸多态性Asp299Gly和Thr399Ile与LPS的反应减低有关, TLR4基因突变可导致

对LPS无反应, 或LPS信号途径的抑制. 野生型TLR4的表达增强可使LPS信号传导增强. TLR2主要识别多种病原微生物的产物以及革兰氏阳性菌、分枝杆菌、螺旋体和支原体^[10], TLR2通过识别PAMPs激活NF- κ B, 导致炎症因子(如IL-8)表达, 同时激活的NF- κ B还可促进TLR2的转录表达, 形成了TLR2-NF- κ B-TLR2的自身循环. 研究表明TLRs/NF- κ B信号传导通路是IBD发病机制发展过程中的重要环节. 最近Matsuguchi *et al*^[11]观察到, 经腹腔注射LPS或体外LPS刺激后, 小鼠脾巨噬细胞的TLR2基因表达增高, 而TLR4并未见增高. Yang *et al*^[12]和Kirsching *et al*^[13]也分别发现转染了人TLR2的人胚肾细胞的293可获得对LPS的反应能力, 因此, 认为TLR2参与人体内对LPS的反应. LPS不仅在感染疾病、过敏性疾病中起重要作用, 还可促进结肠癌细胞株的生长, 有促癌作用. TLR4、TLR2基因突变可改变肠黏膜先天性免疫细胞和肠上皮TLR4、TLR2分子结构, 使机体的免疫系统失去正常处理肠腔内大量细菌和LPS等病原分子的能力, 进而使肠黏膜在其长期刺激下产生感染、炎症、过敏、易激乃至癌变.

通过对TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu和Arg677Trp多态性进行检测, 在所有310例样本中均未发现TLR4、TLR2基因的上述突变, 提示此等位基因突变在中国湖北汉族人群中极少见, 而且说明TLR4Asp299Gly、TLR2基因Arg753Glu和Arg677Trp位点多态性可能与我国IBD无关. Mane研究白人IBD患者TLR2基因突变, 只发现A7484T位点有意义, 亚洲人和黑人未见阳性报道. 本实验结果与之相符.

此外, 我们将中国汉族与其他种族的TLR4基因的Asp299Gly、TLR2基因的Arg753Glu

和Arg677Trp多态性分布进行了比较,发现在不同人群中,该等位基因频率及基因型频率的分布有差异,其中中国湖北汉族人与日本人的等位基因频率及基因型频率相似,均未检测到TLR4基因Asp299Gly、TLR2基因Arg753Glu和Arg677Trp的突变位点,德国人TLR4基因的Asp299Gly突变频率5.6%,Arg753Glu突变频率9.4%、西班牙Arg753Glu突变频率1%^[14],突尼斯Arg677Trp为31%^[15],差异有显著性.由此认为,其等位基因的多态性随人种和地区的不同而异.各人种在TLR2基因频率分布的不同,将有助于阐明不同种族和不同地区人群在进化和免疫发病机制上的差异.

4 参考文献

- 1 Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010-7017
- 2 Kojima M, Morisaki T, Izuhara K, Uchiyama A, Matsunari Y, Katano M, Tanaka M. Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kappa B activation. *Oncogene* 2000; 19: 1225-1231
- 3 Malhotra D, Relhan V, Reddy BS, Bamezai R. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. *Hum Genet* 2005; 116: 413-415
- 4 Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31: 53-58
- 5 Schroder NWJ, Hamann LUBG, Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med* 2003; 81: 368-372
- 6 Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber THJ, Drenth JPH, Van der Meer JWM. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2052-2059
- 7 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001; 21: 236-239
- 8 Okayama N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamaoka Y, Fujiwara M, Matsubara T, Maekawa T, Hazama S, Oka M, Nohara H, Kayano K, Okita K, Hinoda Y. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the Toll-like receptor-4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 56-58
- 9 Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine* 2002; 20: 56-62
- 10 Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001; 2: 346-352
- 11 Matsuguchi T, Takagi K, Musikacharoen T, Yoshi-kai Y. Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* 2000; 95: 1378-1385
- 12 Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; 395: 284-288
- 13 Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998; 188: 2091-2097
- 14 Sanchez E, Orozco G, Lopez-Nevot MA, Jimenez-Alonso J, Martin J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2004; 63: 54-57
- 15 Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 625-626

■同行评价

内容新颖,对读者也有一定启发.

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

促甲状腺激素释放激素在应激性溃疡致病过程中的作用

郭益民, 李旭, 陈然, 夏钦贵

■背景资料

在应激状态下, 机体合成和分泌 TRH 增加. 重复的应激刺激可减少甲状腺激素的分泌, 但下丘脑 TRH 的分泌未见改变. 可见, TRH 在应激性溃疡的发病过程中的作用及其机制尚不完全清楚. 本文的目的是观察 TRH 在应激性溃疡发病中的作用, 并探讨其可能的作用机制.

郭益民, 李旭, 陈然, 夏钦贵, 温州医学院生理学教研室 浙江省温州市 325035

温州市科学技术委员会基金资助项目, No. 00010

通讯作者: 郭益民, 325035, 浙江省温州市, 温州医学院生理学教研室. gym@wzmc.net

电话: 0577-86689769

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-12-02

Role of thyrotropin-releasing hormone in formation of stress ulcer

Yi-Min Guo, Xu Li, Ran Chen, Qin-Gui Xia

Yi-Min Guo, Xu Li, Ran Chen, Qin-Gui Xia, Department of Physiology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China

Supported by the Fund from Wenzhou Science and Technology Committee, No. 00010

Correspondence to: Yi-Min Guo, Department of Physiology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China. gym@wzmc.net

Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-12-02

Abstract

AIM: To investigate the role of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the rat ulcer induced by cold-restraint stress and its possible mechanism.

METHODS: The rat model of stress ulcer was constructed by cold-restraint method. The changes of gastric mucosa, gastric juice secretion, and gastric motility were evaluated after injection of TRH or TRH antiserum into the lateral ventricle.

RESULTS: Three hours after the administration of TRH, severe damages were observed in the gastric mucosa of rats fasting for 24 h at room temperature. As compared with the control group, the volume of gastric juice secretion (5.5 ± 0.7 mL/2 h vs 2.7 ± 0.6 mL/2 h, $P < 0.01$) and total acid output (539.4 ± 50.5 μ mol HCl/2 h vs 317.7 ± 45.3 μ mol HCl/2 h, $P < 0.05$) were increased markedly. Gastric wall mucus secretion was decreased (1.35 ± 0.08 vs 2.21 ± 0.11 , $P < 0.01$), while the frequency of gastric contraction (1.2 ± 0.2 vs 0.4 ± 0.1 , $P < 0.01$), the width of contractive wave

(17.2 ± 2.0 vs 8.1 ± 1.1 , $P < 0.01$), and the motility index per minute (90.3 ± 14.2 vs 13.2 ± 3.1 , $P < 0.01$) were elevated significantly. The administration of TRH antiserum significantly inhibited the gastric mucosa damage caused by cold restraint stress (ulcer index: 10.2 ± 3.9 vs 30.3 ± 5.5 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: The injection of TRH into the lateral ventricle can induce gastric mucosal ulcer, which is similar to the stress ulcer. The enhancement of TRH synthesis in the brain plays a crucial role in the gastric mucosal damage induced by cold-restraint stress.

Key Words: Thyrotropin-releasing hormone; Stress ulcer; Lateral ventricle

Guo YM, Li X, Chen R, Xia QG. Role of thyrotropin-releasing hormone in formation of stress ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):216-219

摘要

目的: 探讨促甲状腺激素释放激素(TRH)在冷束缚应激性溃疡发病中的作用及其机制.

方法: 选用SD大鼠制备应激性溃疡模型, 观察侧脑室注射TRH或TRH抗血清后对胃黏膜、胃液的分泌量和胃运动的影响.

结果: 侧脑室注射TRH 3 h后, 可使室温条件下禁食24 h的清醒大鼠胃黏膜严重损伤, 胃液量(5.5 ± 0.7 mL/2 h vs 2.7 ± 0.6 mL/2 h, $P < 0.01$)和总酸排出量(539.4 ± 50.5 μ mol HCl/2 h vs 317.7 ± 45.3 μ mol HCl/2 h, $P < 0.05$)均比对照组明显增加, 胃壁结合黏液的分泌减少(1.35 ± 0.08 vs 2.21 ± 0.11 , $P < 0.01$), 胃收缩频率(1.2 ± 0.2 vs 0.4 ± 0.1 , $P < 0.01$)、收缩波宽度(17.2 ± 2.0 vs 8.1 ± 1.1 , $P < 0.01$)和每分胃运动指数(90.3 ± 14.2 vs 13.2 ± 3.1 , $P < 0.01$)均明显高于对照组, 冷束缚应激引起的大鼠胃黏膜损伤作用能被侧脑室注射TRH抗血清明显抑制(溃疡指数: 10.2 ± 3.9 vs 30.3 ± 5.5 , $P < 0.01$).

结论: 侧脑室注射TRH可使胃黏膜产生与应激相类似的溃疡, 脑内TRH合成分泌增多是冷

束缚应激时胃黏膜损伤的重要原因。

关键词: 促甲状腺激素释放激素; 应激性溃疡; 侧脑室

郭益民, 李旭, 陈然, 夏钦贵. 促甲状腺激素释放激素在应激性溃疡致病过程中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(2):216-219
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/216.asp>

0 引言

冷束缚应激性溃疡(cold-restraint stress ulcer)是一种多因素引起的急性胃黏膜损伤, 其发病可能是黏膜、血管、激素和神经等因素之间相互关联的结果, 但这些因素的致病机制尚不完全清楚^[1]. 激素在应激性溃疡中的作用早已受到重视, 在应激状态下, 机体合成和分泌促肾上腺皮质激素(ACTH)、糖皮质激素、生长素、催乳素、肾上腺素和去甲肾上腺素明显增多^[2]. 在应激状态下, 给幽门部结扎大鼠侧脑室注射催产素, 可抑制胃酸的分泌, 产生抗溃疡形成作用^[3]; 侧脑室注射催乳素, 可显著增加自由酸、总酸和溃疡指数^[4]. 上述资料表明, 催产素、催乳素可能参与应激性溃疡的形成. 近年来, 应激状态下促甲状腺激素释放激素(TRH)合成分泌增加受到重视. 急性头部外伤患者的应激性溃疡的产生与下丘脑功能失调有关^[2]. Koivusalo *et al*^[5]报道, 短时间的应激就可使下丘脑TRH增加41%. 有报道, 失血30%可使大鼠脑内隔区、伏隔核和视前区等部位TRH大量释放^[6]; Maeda *et al*^[7]发现, 在浸水应激大鼠胃液内TRH含量显著增加. 但近来发现, 重复的应激刺激可减少甲状腺激素的分泌, 但下丘脑TRH的分泌未见改变^[8]. 在应激状态下, CRH可通过生长抑素抑制TRH的分泌^[9]. 这些资料表明, 在应激性溃疡的发病过程中可能有TRH的参与, 但其作用机制尚不清楚. 我们的目的是观察TRH在应激性溃疡发病中的作用, 并探讨其可能的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 选用Sprague Dawley大鼠, 雌雄不拘, 体质量180-250 g. 实验分两个阶段进行, 第一阶段观察TRH是否参与冷束缚应激性溃疡的致病过程; 第二阶段探讨TRH参与冷束缚应激性溃疡的作用机制.

1.2 方法

1.2.1 应激性溃疡模型制备 实验前动物禁食24 h, 自由饮水. 实验时将用乙醚轻度麻醉的大

鼠束缚于铁栅上, 待动物清醒后放入4℃的冰箱内应激, 3 h后取出脱颈处死. 剖腹, 结扎贲门和幽门后取胃, 向胃内注入生理盐水10 mL, 并浸入20 g/L福尔马林溶液中10 min, 以固定胃表面. 然后沿胃大弯剪开展平, 用生理盐水将胃内容物冲洗干净, 可见局限于腺胃部黏膜有点状或索条状出血病灶, 记录各病灶长度并将其计分. 病灶长度小于1 mm记1分, 1-2 mm记2分, 2-3 mm记3分, 依次类推, 若病灶宽度大于2 mm, 则分数加倍. 各病灶分数总和作为该胃的溃疡指数^[4].

1.2.2 侧脑室注射方法 大鼠用乙醚麻醉后固定于立体定位仪上, 纵行切开头皮, 暴露颅骨, 于前凶点后1.5 mm、中线旁开1.5 mm处钻孔, 用微量注射器(针管外径0.3 mm)垂直刺入3.5-4.5 mm, 回抽见有脑脊液回流时将10 μL药液注入, 2 min内注毕.

1.2.3 胃酸测定 参照Wong *et al*^[10]的方法, 侧脑室注射TRH后, 在乙醚轻度麻醉下, 经腹腔小切口结扎幽门, 术后关闭腹腔, 动物清醒后放回饲养笼内, 禁食、禁水2 h后处死动物, 结扎贲门、取胃, 收集胃内容物, 离心, 用酚红作指示剂, 以0.01 mol/L NaOH滴定胃酸排出量^[4].

1.2.4 胃壁结合黏液的测定 按照汪建英 *et al*^[11]阿利斯蓝染色法测定胃壁结合黏液. 将动物处死后取胃, 沿胃小弯剪开并外翻, 浸入20 mL阿利斯蓝染液中(阿利斯蓝溶解于pH 5.8的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中), 25℃孵育2 h后取出胃, 将反应液离心10 min, 取上清液在721型分光光度计上于615 nm波长比色. 根据下列公式算出结合染料量.

$$\text{结合染料量(mg)} = 4 - \frac{20 \times \text{实测光密度}}{\text{标准管光密度} \times 5}$$

公式中“4”为20 mL染液中所含染料的mg数, 胃结合的染料量反映胃壁结合黏液的分泌量.

1.2.5 胃运动的记录 参考Mersereau *et al*^[12]方法, 用水囊连接压力换能器和二道生理记录仪进行记录. 胃运动的观察指标包括: (1)收缩频率; (2)收缩波幅度; (3)收缩波宽度; (4)每分胃运动指数(MMI): 前三项指标乘积总和除以时间.

统计学处理 实验数据以均数±标准差(mean±SD)表示. 用*t*检验进行结果显著性检验.

2 结果

2.1 观察TRH是否参与冷束缚应激性溃疡的致

■ 研究前沿

冷束缚应激性溃疡是一种多因素引起的急性胃黏膜损伤, 目前的研究主要集中在各种下丘脑调节肽、垂体激素和神经等因素在应激性溃疡中的作用及他们之间的相互关系.

■创新盘点

本文证实,侧脑室注射TRH可使胃黏膜产生与应激相类似的溃疡,冷束缚应激引起的大鼠胃黏膜损伤作用能被侧脑室注射TRH抗血清明显抑制,这种通过免疫中和作用引起应激性溃疡的抑制,最直接地证实了脑内TRH合成分泌增多是冷束缚应激时胃黏膜损伤的重要原因。

表 1 侧脑室注射TRH抗血清对冷束缚应激大鼠胃黏膜损伤的影响

组别	n	溃疡指数
对照组	8	30.3 ± 5.5
实验组	8	10.2 ± 3.9 ^b

^bP<0.01 vs 对照组。

表 2 侧脑室注射TRH对大鼠胃黏膜的损伤作用

组别	n	溃疡指数
对照组	5	0
实验组	8	23.7 ± 4.5 ^b

^bP<0.01 vs 对照组。

表 3 侧脑室注射TRH对大鼠胃酸分泌的影响

组别	n	胃液量 (mL/2 h)	总酸排出量 (μmol HCl/2 h)
对照组	6	2.7 ± 0.6	317.7 ± 45.3
实验组	6	5.5 ± 0.7 ^b	539.4 ± 50.5 ^a

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组。

病过程 动物随机分为对照组和实验组。对照组在icv正常兔血清10 μL 1 h后进行冷束缚应激(cold-restraint stress)3 h; 实验组在icv TRH抗血清(TRH antiserum, 美国弗吉尼亚大学皇甫东海博士惠赠)10 μL 1 h后再进行冷束缚应激3 h。结果见表1。结果表明, TRH抗血清能显著抑制冷束缚应激性溃疡的形成。提示在冷束缚应激性溃疡的发病过程中, 冷束缚应激性溃疡TRH起重要作用, 脑内TRH合成分泌增多可能是冷束缚应激时胃黏膜损伤的重要原因。

2.2 探讨TRH参与冷束缚应激性溃疡的可能作用机制 动物随机分为对照组和实验组。对照组icv生理盐水10 μL; 实验组icv TRH 10 μg/10 μL(中科院上海生化所东风生化技术公司)。

2.2.1 icv TRH对胃黏膜的损伤作用 对照组胃黏膜光滑无损, 而实验组腺胃区黏膜有点状或索条状出血灶, 损伤严重(表2)。

2.2.2 icv TRH对胃酸排出量的影响(表3) 实验组胃液量和总酸排出量都比对照组明显增加, 表明TRH能刺激胃酸分泌。

2.2.3 icv TRH对胃壁结合黏液分泌的影响(表4) 两组差异显著, 表明icv TRH可减少胃壁结合黏液的分泌。

2.2.4 icv TRH对胃运动的影响(表5) 实验组胃收

表 4 侧脑室注射TRH对大鼠胃壁结合黏液分泌的影响

组别	n	结合于胃壁黏液的阿利斯蓝量 (mg)
对照组	6	2.21 ± 0.11
实验组	8	1.35 ± 0.08 ^b

^bP<0.01 vs 对照组。

表 5 侧脑室注射TRH对大鼠胃运动的影响

组别	n	收缩频率 (次/min)	收缩波 幅度 (mm)	收缩波 宽度 (s)	每分胃运动 指数 (MMI)
对照组	5	0.4 ± 0.1	12.6 ± 1.8	8.1 ± 1.1	13.2 ± 3.1
实验组	8	1.2 ± 0.2 ^b	16.2 ± 1.6	17.2 ± 2.0 ^b	90.3 ± 14.2 ^b

^bP<0.01 vs 对照组。

缩频率、收缩波宽度和每分胃运动指数均明显高于对照组。表明侧脑室注射TRH能引起胃运动加强。

3 讨论

我们观察到侧脑室注射TRH后3 h, 可使室温条件下禁食24 h的清醒大鼠胃黏膜严重损伤, 表明侧脑室注射TRH可使胃黏膜产生与应激相类似的溃疡。另外, 我们也观察到冷束缚应激引起的大鼠胃黏膜损伤作用能被侧脑室注射TRH抗血清明显抑制, 这种通过免疫中和作用引起应激性溃疡的抑制, 最直接地证实了脑内TRH合成分泌增多是冷束缚应激时胃黏膜损伤的重要原因。

目前认为, 胃黏膜溃疡的根本原因是黏膜损害(致溃疡)因素与黏膜保护(黏膜抵抗)因素之间失去平衡。胃酸和胃蛋白酶的消化作用是极为重要的损害因素, 而胃黏液——胃黏膜屏障和胃黏膜的血液循环在黏膜的保护因素中占有主要地位^[13]。本研究观察到侧脑室注射TRH后可使胃酸分泌增加, 胃黏液分泌减少和胃运动加强, 表明TRH在外周是通过增加胃酸分泌、减少胃黏液分泌和加强胃肌收缩活动等作用途径而引起应激性溃疡的。在应激性溃疡的形成过程中, 胃酸、胃黏液和胃运动何者起主要作用, Garrick *et al*^[14]报道罂粟碱显著减轻浸水应激大鼠的胃黏膜损伤是通过抑制胃肌收缩起作用的, 他对胃酸的分泌没有影响。Wong *et al*^[10]观察到钙拮抗剂propyl-methylenedioxyindene抗冷束缚应激性溃疡作用与他抑制胃运动作用密切相关。Hayase *et al*^[15]发现浸水应激性溃疡大鼠的胃酸

分泌较应激前减少. 这些研究表明, 在应激性溃疡的发生过程中, 胃酸不起主要作用, 而胃肌的运动显著增强, 长时间、高幅度的胃肌收缩是应激性溃疡的主要原因. 胃肌强烈收缩, 使胃黏膜血流阻力增加, 血流量明显减少, 血液循环障碍, 导致黏膜缺血坏死, 坏死的组织经胃酸和胃蛋白酶的作用形成溃疡; 黏液分泌的减少使胃黏膜屏障作用减弱进一步促进溃疡的形成.

我们以往的工作表明, 中枢注射TRH促进胃液分泌, 胃肌运动加强等作用可能是经下丘脑-中缝核-复合迷走背核-迷走神经这一通路起作用^[16]. 迷走背核受到下丘脑TRH神经元的影响^[17]. 因此, 我们推测在应激状态下, 脑内TRH也可能通过上述通路引起胃黏膜的损伤.

此外, Hernandez^[18]认为, 应激时, 下丘脑TRH刺激垂体合成和分泌促甲状腺激素, 许多刺激下丘脑分泌TRH的因素都不可避免地刺激下丘脑-腺垂体-甲状腺轴(HPT)的活动, 而甲状腺对垂体分泌促甲状腺激素有强大的负反馈抑制作用. 他们发现能抑制应激性溃疡形成的物质, 如多巴胺、催乳素、神经降压素、生长抑素、 β -内啡肽、 γ -氨基丁酸和蛙皮素等对HPT轴均具有抑制作用. 在冷束缚应激反应中, 甲状腺机能亢进大鼠比甲状腺机能正常或减退大鼠对应激性溃疡有更大的抵抗力, 甲状腺机能减退大鼠往往出现更为显著的应激性溃疡. 这些资料为应激性溃疡发病过程中涉及HPT轴的功能提供了极为有力的证据.

然而, TRH参与应激性溃疡的中枢作用机制是极其复杂的. 有人发现切除垂体或切除甲状腺都不影响应激时下丘脑以外部位的TRH含量, 表明下丘脑以外的TRH通路在应激性溃疡中也可能被涉及.

总之, TRH参与应激性溃疡的发病过程, 但其中枢机制复杂, 有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 Tuncel N, Erkasap N, Sahinturk V, Ak DD, Tuncel M. The protective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on stress-induced gastric ulceration in rats. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 865: 309-322
- 2 Hwang SL, Lieu AS, Howng SL, Hsieh JS, Huang TJ. Hypothalamic dysfunction in acute head-injured

- patients with stress ulcer. *Kaohsiung J Med Sci* 1998; 14: 554-560
- 3 Asad M, Shewade DG, Koumaravelou K, Abraham BK, Vasu S, Ramaswamy S. Effect of centrally administered oxytocin on gastric and duodenal ulcers in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 488-492
- 4 Asad M, Shewade DG, Koumaravelou K, Abraham BK, Vasu S, Ramaswamy S. Effect of centrally administered prolactin on gastric and duodenal ulcers in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15: 175-179
- 5 Koivusalo F, Leppaluoto J. Brain TRF immunoreactivity during various physiological and stress conditions in the rat. *Neuroendocrinology* 1979; 29: 231-236
- 6 Okuda C, Sawa T, Harada M, Miyazaki M. Hemorrhage-induced regional brain thyrotropin-releasing hormone release in conscious rats measured by microdialysis. *Life Sci* 1990; 47: 1997-2002
- 7 Maeda Y, Morise K, Kusugami K, Uchida K, Fursawa A, Kaneko H, Nakada K, Mitsuma T, Kurimoto F. Effects of water-immersion-induced stress and intraperitoneal administration of brain-gut peptides upon immunoreactive thyrotropin-releasing hormone and prostaglandin E2 concentrations in the rat stomach. *Gastroenterol Jpn* 1991; 26: 417-423
- 8 Helmreich DL, Parfitt DB, Lu XY, Akil H, Watson SJ. Relation between the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology* 2005; 81: 183-192
- 9 Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 2002; 53: 865-871
- 10 Wong WS, Rahwan RG, Stephens RL Jr. Antiulcer activity of the calcium antagonist propyl-methylenedioxyindene. IV. Effects on gastric lesions in rats induced by cold-restraint stress and thyrotropin-releasing hormone. *Life Sci* 1990; 47: 1483-1489
- 11 汪建英, 王志均. 适应性细胞保护作用与胃黏液-碳酸氢盐屏障的关系. *生理学报* 1987; 39: 161-167
- 12 Mersereau WA, Hinchey EJ. Synergism between acid and gastric contractile activity in the genesis of ulceration and hemorrhage in the phenylbutazone-treated rat. *Surgery* 1981; 90: 516-522
- 13 Kwiczen S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 39-50
- 14 Garrick T, Buack S, Bass P. Gastric motility is a major factor in cold restraint-induced lesion formation in rats. *Am J Physiol* 1986; 250: G191-G199
- 15 Hayase M, Takeuchi K. Gastric acid secretion and lesion formation in rats under water-immersion stress. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 166-171
- 16 夏钦贵. 促甲状腺激素释放激素与胃肠道功能. *生理科学进展* 1993; 24: 168-171
- 17 Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19: 519-525
- 18 Hernandez DE. Neuroendocrine mechanisms of stress ulceration: focus on thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Life Sci* 1986; 39: 279-296

■应用要点

本项研究目前主要还处于基础研究阶段, 通过今后对TRH在应激性溃疡中作用的深入研究, 对于应激性溃疡的发病机制及其治疗具有重要的指导意义.

■同行评价

本文实验数据比较明确, 结果对于应激性溃疡的研究有指导作用. 不足之处是: 脑室注射TRH导致胃黏膜损伤的剂量-效应关系缺少实验数据.

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

人胚胎肝干细胞的形态特点

蒋吉英, 赵立民, 张 杰, 齐安东, 于树娜

■背景资料

由于肝干细胞具有自我复制和双向分化潜能, 故肝干细胞可望成为严重肝疾患细胞替代疗法以及构成生物人工肝的供体细胞, 因此使其成为当前的一个研究热点。肝干细胞应用中首先要解决的问题为肝干细胞的识别、鉴定。成年哺乳动物肝中的肝干细胞的存在部位尚不确定。在胚胎发育过程中, 个体的每个器官的形成即是该器官原基内干细胞增殖、分化、成熟的过程, 故早期胚胎可为器官干细胞的研究提供大量的有用信息。

蒋吉英, 赵立民, 张杰, 齐安东, 于树娜, 潍坊医学院解剖学教研室 山东省潍坊市 261042

通讯作者: 蒋吉英, 261042, 山东省潍坊市, 潍坊医学院解剖学教研室. jiangjiying2002@163.com

电话: 0536-8753618

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-11-24

Morphological characteristics of human embryonic hepatic stem cells

Ji-Ying Jiang, Li-Min Zhao, Jie Zhang, An-Dong Qi, Shu-Na Yu

Ji-Ying Jiang, Li-Min Zhao, Jie Zhang, An-Dong Qi, Shu-Na Yu, Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Correspondence to: Ji-Ying Jiang, Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China. jiangjiying2002@163.com

Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To observe the morphological features, temporal-spatial distribution and differentiation of hepatic stem cells in the early stage of human embryonic livers.

METHODS: Paraffin sections were prepared from human embryos of 3 to 12 wk by routine method. Immunohistochemical staining was used to observe the development of human embryonic livers and hepatic stem cells as well as the expression of α -fetoprotein (AFP), c-Met and cytokeratin 19 (CK19) under light microscope.

RESULTS: Liver buds came into being in wk 3, hepatic cords formed in wk 4, and primal hepatic sinusoids were found in wk 5. The hepatic cells of the 3-5 wk displayed the typical features of immature cells: small size, a round or ovoid nuclei with dark color, scant cytoplasm with slight blue and a high ratio of nuclei to cytoplasm. Moreover, they were positive for AFP and c-Met. At 6 wk, a part of hepatocytes, whose numbers increased as the growth of the embryos, became larger with nuclei of slight color, which were negative for AFP and c-Met. At 10-12 wk, the AFP- and c-Met-positive cells

were mainly found at the periportal region. The CK19-positive reaction began to appear in some hepatocytes which were similar to the AFP- and c-Met-positive cells at 7 wk. At 10-11 wk, the reaction was confined at the hepatocytes adjacent to the portal region, ductal plate and biliary epithelial cells. At 12 wk, the positive reaction was only found at the ductal plate and biliary epithelial cells. Furthermore, all the cells were positive for AFP, c-Met and CK19 at this time.

CONCLUSION: Hepatocytes of 3-5 wk, phenotyped AFP⁺/c-Met⁺, are homogenous and belong to the hepatic stem cells. At 6 wk, the hepatic stem cells begin to differentiate to hepatocyte system, and then to cholangiocyte system in the next week. Like oval cells in the adult liver, the hepatic stem cells mainly locate at the periportal region at 10-12 wk. The cells characterized by AFP⁺/c-Met⁺/CK19⁺ belong to the progenitor cells of biliary epithelial cells.

Key Words: Human embryos; Hepatic stem cells; Proliferation; Differentiation

Jiang JY, Zhao LM, Zhang J, Qi AD, Yu SN. Morphological characteristics of human embryonic hepatic stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):220-224

摘要

目的: 观察胚胎发育早期肝干细胞的形态特征、时空分布及分化, 以探讨肝干细胞的生物学特征。

方法: 运用发育第3-12 wk人胚标本47例(其中3-5 wk各8例; 6-8 wk各5例, 9-12 wk各2例), 石蜡切片, 连续切片, 免疫组化染色, 光镜下观察人胚肝及肝干细胞的发育及其AFP、c-Met和CK19的时空表达。

结果: 发育第3 wk, 肝芽形成, 第4 wk形成肝索, 第5 wk出现原始肝血窦。第3-5 wk人胚肝芽和肝索细胞排列紧密, 较小, 形态不规则, 核圆形或卵圆形, 核质比例大, 核深染, 胞质颜色较淡, 偏蓝色, 显示出幼稚细胞的形态学特征, 并呈甲胎蛋白(α -Fetoprotein, AFP)、c-Met

阳性反应. 第6 wk, 肝索内出现了体积大、核大、淡染的细胞, 呈AFP、c-Met阴性反应. 随胚龄增加, 这类细胞数量增加. 10-12 wk, AFP、c-Met阳性细胞主要分布于汇管区周围. CK19阳性反应在7 wk时开始出现于一些与AFP、c-Met阳性反应的细胞形态类似的肝索细胞中. 10-11 wk时, CK19阳性反应主要位于汇管区附近的肝索细胞、胆管板细胞及胆管上皮细胞, 12 wk时, CK19阳性信号仅见于胆管板和胆管上皮细胞. 此时所有的胆管板细胞及胆管上皮细胞均呈AFP、c-Met和CK19阳性.

结论: 人胚发育3-5 wk肝实质由肝干细胞组成, 其表型为AFP⁺/c-Met⁺. 6 wk, 肝干细胞开始向肝细胞系分化, 7 wk向胆管系分化, 10-12 wk, 肝干细胞主要局限于汇管区周围的肝索, 与成年肝中卵圆细胞(成年肝干细胞)的分布一致. AFP⁺/c-Met⁺/CK19⁺细胞可能为胆管祖细胞.

关键词: 人胚; 肝干细胞; 增殖; 分化

蒋吉英, 赵立民, 张杰, 齐安东, 于树娜. 人胚胎肝干细胞的形态特点. 世界华人消化杂志 2006;14(2):220-224
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/220.asp>

0 引言

胚胎发育过程中, 器官的发生过程即各器官原基内干细胞增殖、分化、成熟的过程, 故早期胚胎可为器官干细胞的研究提供大量的有用信息. 由于肝干细胞具有自我复制和双向分化潜能, 肝干细胞可望成为严重肝疾患细胞替代疗法以及构成生物人工肝的供体细胞^[1-4]. 肝干细胞应用中首先要解决的问题为肝干细胞的识别、鉴定. 但目前研究所观察到的肝干细胞在形态特征、标志物的表达等方面表现出多样性, 对肝干细胞分化时间的报道也不一致, 这对肝干细胞的鉴定和分离带来一定困难^[2-4]. 此外, 肝干细胞的研究多以动物为研究对象, 采用细胞离体培养的方法, 对人胚胎肝干细胞的原位研究资料较为缺乏. 我们利用3-12 wk人胚标本, 选择AFP、CK19、c-Met作为标志物, 观察胚胎发育早期肝干细胞的形态特征、时空分布、分化过程以及分化的结果, 以期对肝干细胞的基础研究和临床应用研究提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究所用47例标本, 均征得孕妇本人知情同意, 实验过程符合伦理标准. 征得孕妇签

字同意后, 收集意外流产, 受精龄为3 mo以内的新鲜人胚胎47例(其中3-5 wk各8例, 6-8 wk各5例, 9-12 wk各2例), 30 min内用4 g/L多聚甲醛固定, 酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 制5 μ m厚的连续切片, 裱于APES包被的载玻片上. 每10张切片1张做HE染色. 在显微镜下, 根据胚层形成情况、体节的数目及器官发育状况确定胚龄.

1.2 方法 确定胚龄后, 选择3-12 wk的标本切片, 每隔10张抽出1张切片, 行免疫组织化学染色(SABC法), 光镜观察, 拍照. 切片常规脱蜡、水化; 3 mL/L H₂O₂孵育10 min, 以封闭内源性过氧化物酶的活性; 0.1 g/L胰蛋白酶孵育10 min(37℃); 多克隆抗c-Met抗体(1/200, 博士德公司), 单克隆抗PCNA、AFP和CK19抗体(1/200, 博士德公司), 4℃孵育过夜; 生物素化的二抗孵育37℃, 1 h(1/200, 博士德公司); 过氧化物酶标记的链酶卵白素37℃, 1 h(1/200, 博士德公司); DAB显色; 苏木素复染; 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. 以PBS代替一抗作阴性对照.

2 结果

2.1 肝干细胞的分布及形态学观察 发育3 wk时, 可见前肠腹侧的一薄层与横隔间充质接触的内胚层细胞由立方形变为高柱状, 并向横隔间充质方向聚集形成肝芽(图1A). 构成肝芽的细胞排列紧密, 较小, 细胞形态不规则, 核圆形或卵圆形, 核质比例大, HE染色核深染, 胞质颜色为淡蓝色. 4 wk时, 肝芽的细胞伸入横隔间充质内, 被间充质分割形成肝索. 此时肝索排列稀疏, 肝索之间可见少量的间充质细胞和散在分布的原始血细胞, 构成肝索的细胞形态特点与第3 wk肝芽细胞相同(图1B). 5 wk时, 肝索数量增多, 组成肝索的细胞仍具上述特点, 但细胞数量明显增加. 在肝索间出现原始肝血窦(图1C). 胚胎发育6 wk时, 多数肝索细胞与3-5 wk的肝索细胞具有相似的特征, 但肝索中出现少数与上述细胞明显不同的细胞: 体积大, 多边形, 胞核大、淡染、核仁明显(图1D). 7 wk时, 肝索内和肝索间有大量造血灶, 肝索的形态和排列不规则. 肝索细胞由上述两类细胞组成. 原始胆小管已出现, 由6 wk出现的体积大, 多边形, 胞核大、淡染、核仁明显的肝索细胞围成, 尚未见胆管板(图1E). 10 wk, 中央静脉形成, 肝索沿着中央静脉呈放射状排列, 肝小叶初步形成. 肝索中以胞体大、核淡染的细胞为主. 在较大门

■ 研究前沿

目前研究所观察到的肝干细胞在形态特征、标志物的表达等方面表现出多样性, 对肝干细胞分化时间的报道也不一致, 这对肝干细胞的鉴定和分离带来一定困难. 此外, 肝干细胞的研究多以动物为研究对象, 采用细胞离体培养的方法, 对人胚胎肝干细胞的原位研究资料较为缺乏.

■创新盘点

本文选择AFP、CK19、c-Met作为标志物,在不同发育时期的人胚胎肝标本上连续观察胚胎发育早期肝干细胞的形态特征、时空分布及其分化。结果发现,3-5 wk肝实质由肝干细胞组成,其表型为AFP⁺/c-Met⁺,这些细胞在6 wk开始向肝细胞系分化,7 wk向胆管系分化,10-12 wk,肝干细胞主要局限于汇管区周围的肝索,与成年肝中卵圆细胞(成年肝干细胞)的分布一致。AFP⁺/c-Met⁺/CK19⁺细胞可能为胆管祖细胞。

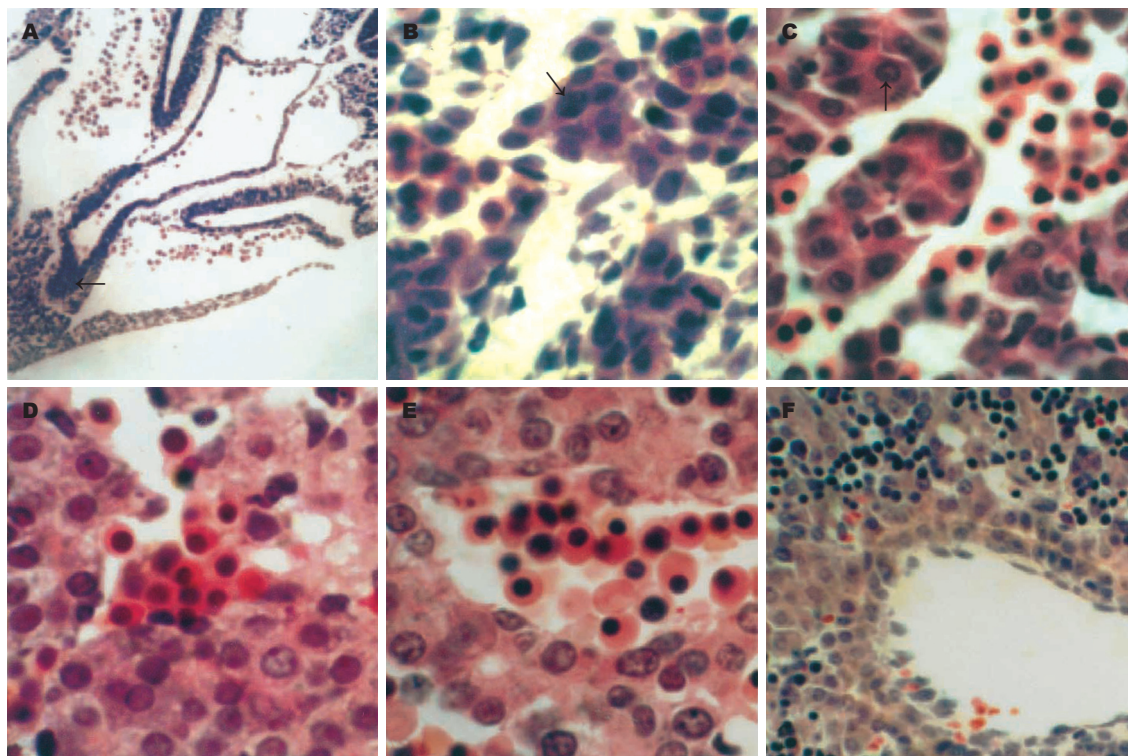


图1 肝干细胞的分布及形态(箭头示肝干细胞, HE染色, A×200, B, C, D×1000, F×400)。A: 3 wk; B: 4 wk; C: 5 wk; D: 6 wk; E: 7 wk; F: 11 wk。

静脉分支的附近开始出现胆管板,胆管板的两层细胞排列紧密,其间无明显的间隙。组成胆管板的细胞较肝索细胞小,圆形,核卵圆形、核质比例大、核深染。11-12 wk肝索的细胞特征与10 wk时相似,但胆管板的数量和长度均增加,双层的胆管板细胞分开,形成管腔(图1F)。12 wk肝小叶的数量增多,出现小叶间动脉、静脉及小叶间胆管,典型的小叶结构可辨认,此时肝的结构与成年肝相似。

2.2 PCNA、AFP、c-Met、CK19在3-12 wk胚胎肝中的表达 发育3-4 wk时,肝索的细胞呈PCNA的反应阴性,5 wk时多数肝索细胞为PCNA阳性,阳性反应沉淀物分布在细胞核,偶见呈阳性反应的造血细胞和血管内皮细胞(图2A)。随着胚胎的发育,阳性的肝索细胞数目减少,阳性的造血细胞和内皮细胞增多(图2B)。

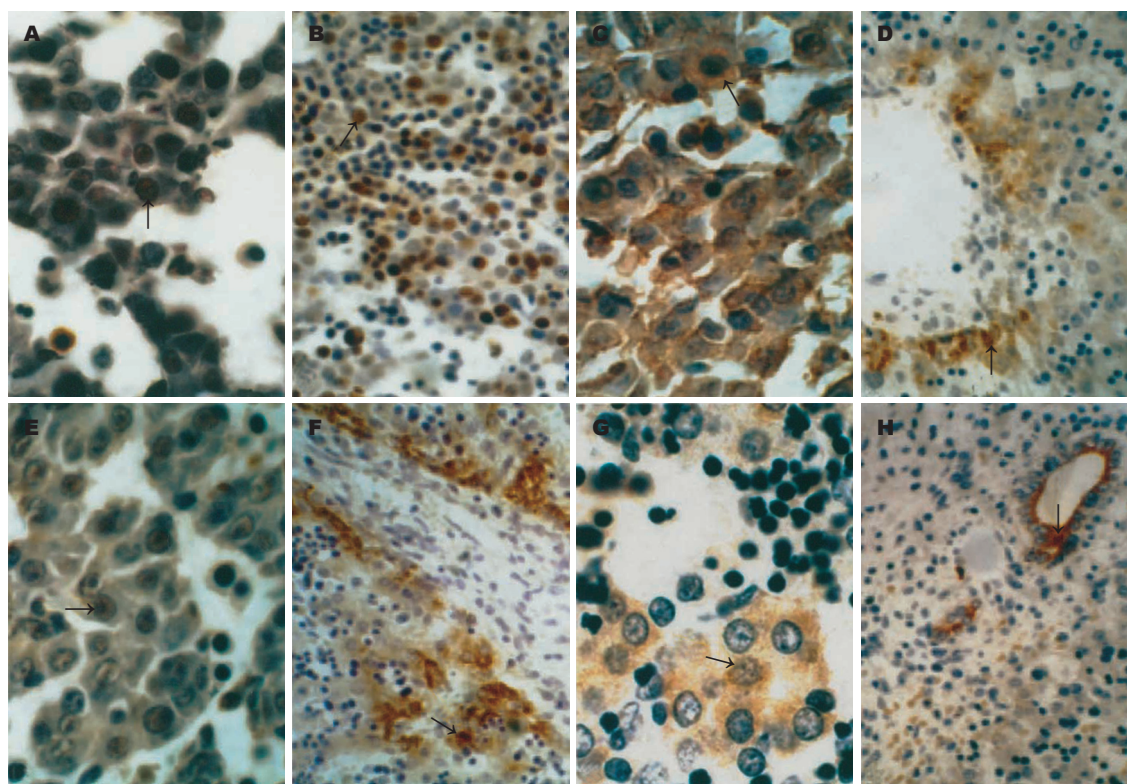
3-5 wk时肝芽和肝索的所有细胞都为AFP和c-Met阳性反应,阳性反应沉淀物主要分布于细胞核及胞质(图2C, E)。6 wk时多数肝索细胞仍为AFP、c-Met阳性,只有在6 wk才出现的少数体积较大,核大,核仁明显的细胞呈AFP、c-Met阴性反应。随着胚胎肝的发育,AFP、c-Met阳性细胞的数量逐渐减少,至10-12 wk时,AFP、c-Met阳性反应主要局限于汇管区附近的

肝索细胞以及胆管板的细胞及胆管上皮细胞(图2D, F)。

CK19免疫反应在7 wk开始出现,此时围成原始胆管的肝索细胞均呈CK19阳性反应(图2G)。8-9 wk时,CK19的免疫反应的分布及阳性细胞的数量与7 wk时相似。10 wk时,CK19阳性反应主要位于汇管区附近的肝索细胞、胆管板细胞及胆管上皮细胞。CK19阳性细胞的数量较AFP、c-Met阳性细胞少。12 wk时,CK19阳性信号仅见于胆管板和胆管上皮细胞,在肝索细胞中无CK19免疫反应(图2H)。

3 讨论

3.1 肝干细胞的形态特征及标志物 肝干细胞来源于前肠内胚层,受原始心脏中胚层细胞的诱导,前肠腹侧末段的部分内胚层细胞特化(specification)为肝干细胞^[5]。AFP是胚胎发育过程中出现的一个主要的清蛋白,Shiojiri *et al*^[6]发现,AFP mRNA在10.5 d大鼠胚胎前肠腹侧的内胚层细胞中表达,1 d后形成肝索时出现AFP蛋白的表达,提示AFP的表达是肝干细胞特化的开始。Suzuki *et al*^[7]观察到c-Met特异地在肝干细胞中表达,认为是各种动物肝干细胞的标志。我们观察到,3-5 wk时,组成肝索的细胞为AFP、



■应用要点
为肝干细胞的基
础研究和临床应
用研究提供实验
依据。

图 2 PCNA、AFP、c-Met、CK19免疫组化染色 (箭头示免疫反应阳性细胞. A, C, E, G×1 000; B, D, F, H×400). A: PCNA 5 wk; B: PCNA 11 wk; C: AFP 5 wk; D: AFP 11 wk; E: c-Met 5 wk; F: c-Met 11 wk; G: CK19 7 wk; H: CK19 11 wk.

c-Met阳性, 这些细胞紧密排列, 细胞较小, 形态不规则, 核圆形或卵圆形, 核质比例大, 核深染, 胞质颜色较淡, 偏蓝色, 显示出幼稚细胞的形态学特征^[8], 并与吴淑兰 *et al*^[9]描述的分化程度较低的暗细胞形态学一致. 在其后的分化过程中, 这种幼稚细胞也一直存在, 只是数量和分布发生了变化(见3.2). 由于3-5 wk时人胚胎肝只有一种具有幼稚细胞特征的细胞类型并为AFP和c-Met阳性, 本文推测3-5 wk人胚肝实质由肝干细胞组成, AFP、c-Met联合使用可以标记肝干细胞. 5 wk此类细胞多数为PCNA阳性的结果提示此阶段肝干细胞正在增殖.

3.2 肝干细胞的分化及其分化结果 我们观察到, 发育6 wk时, 肝索中出现少量与幼稚细胞不同、而与成熟肝细胞有相似特征的细胞: 体积大, 呈多边形, 胞核大、淡染、核仁明显, 这些细胞为AFP、c-Met免疫反应阴性, 这与吴淑兰描述的分化程度较高的明细胞形态学一致, 提示这些是已经开始分化的细胞. 这种细胞的数量随胚胎龄增大而增加, 而具有幼稚细胞特征的AFP、c-Met阳性细胞数量却相应下降. 这提示, 6 wk时, 肝干细胞开始向肝细胞方向分化, 6-9 wk是肝干细胞向肝细胞系分化的阶段. 已经分化的肝细胞为AFP、c-Met免疫反应阴性.

10-12 wk时, AFP、c-Met阳性的肝干细胞局限于汇管区周围的肝索内, 这与成年肝中肝卵圆细胞(成年肝干细胞)的分布一致^[10-14].

本研究还观察到, 发育7 wk时, 原始胆小管形成, 10 wk时, 开始出现胆管板, 11-12 wk, 双层的胆管板细胞分开形成胆管, 提示胆管细胞的分化从7 wk开始, 比肝细胞的分化晚1 wk. CK19是成熟胆管细胞的标志物^[14], 但有研究发现, 发育早期的肝干细胞表达CK19^[4], 因此有研究者^[15,16]将CK19作为筛选肝干细胞标志物. 本研究注意到, 7 wk时, 当原始胆小管出现时, 与AFP、c-Met阳性细胞形态相似的细胞也出现CK19阳性反应, 这表明, 7 wk时的AFP⁺/c-Met⁺/CK19⁺细胞表型与3-6 wk时的肝干细胞(AFP⁺/c-Met⁺)不同, 当AFP⁺/c-Met⁺的肝干细胞中出现CK19免疫反应时, 即表明肝干细胞已经开始向胆管细胞方向分化. AFP⁺/c-Met⁺/CK19⁺的肝干细胞应视为胆管祖细胞, AFP⁺/c-Met⁺表达提示他们来自肝干细胞, 这支持胆管细胞的肝干细胞来源学说^[17]. 成熟的胆管细胞只能为CK19所标记. 汇管区附近AFP⁺/c-Met⁺/CK19⁺的细胞是否与AFP⁺/c-Met⁺/CK19⁺的细胞为同一类细胞并代表了成年肝中的肝卵圆细胞, 有待进一步证实.

总之, 发育第3-5 wk人胚胎肝的细胞为未

■同行评价

本文立题于生物人工肝的基础研究,探讨肝干细胞诱导分化的时空分布特征变化,具有相当的基础研究价值及临床应用前景,是一篇立题较新颖,有一定开创性及实用性的研究报道。

分化的肝干细胞。若拟研究人胚胎肝干细胞,此时取材、并利用AFP、c-Met作为筛选标志,可以筛选到具有双向分化潜能的肝干细胞。6 wk时肝干细胞开始向肝细胞分化,7 wk时肝干细胞向胆管系分化。可以共同使用AFP、c-Met、CK19来标记胆管祖细胞。

4 参考文献

- 1 Malhi H, Irani AN, Gagandeep S, Gupta S. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. *J Cell Sci* 2002; 115: 2679-2688
- 2 Germain L, Blouin MJ, Marceau N. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res* 1988; 48: 4909-4918
- 3 Petkov PM, Zavadil J, Goetz D, Chu T, Carver R, Rogler CE, Bottinger EP, Shafritz DA, Dabeva MD. Gene expression pattern in hepatic stem/progenitor cells during rat fetal development using complementary DNA microarrays. *Hepatology* 2004; 39: 617-627
- 4 Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik MA, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* 1996; 23: 476-481
- 5 Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 2000; 92: 83-88
- 6 Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* 1991; 51: 2611-2620
- 7 Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Liver repopulation by c-Met-positive stem/progenitor cells isolated from the developing rat liver. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 423-426
- 8 张静波, 宗书东, 马文丽主编. 干细胞. 第1版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003: 5
- 9 吴淑兰, 曹玉纯, 王仲涛, 应国华, 李向印, 李淑蓉. 对胎儿肝脏的研究(光镜、超薄切片和冷冻复型的电镜观察). *解剖学报* 1981; 12: 310-313
- 10 Alpini G, Aragona E, Dabeva M, Salvi R, Shafritz DA, Tavoloni N. Distribution of albumin and alpha-fetoprotein mRNAs in normal, hyperplastic, and preneoplastic rat liver. *Am J Pathol* 1992; 141: 623-632
- 11 Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 1990; 50: 3811-3815
- 12 Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30: 1425-1433
- 13 Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgerirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 2001; 158: 1313-1323
- 14 Jones EA, Clement-Jones M, James OF, Wilson DI. Differences between human and mouse alpha-fetoprotein expression during early development. *J Anat* 2001; 198: 555-559
- 15 Germain L, Blouin MJ, Marceau N. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res* 1988; 48: 4909-4918
- 16 Strick-Marchand H, Weiss MC. Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos. *Hepatology* 2002; 36: 794-804
- 17 Shiojiri N. Development and differentiation of bile ducts in the mammalian liver. *Microsc Res Tech* 1997; 39: 328-335

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

厦门地区大肠癌人群某些遗传性易感因子和抗性因子的研究

黄如欣, 游攀, 陈长荣, 张忠英, 倪宏英, 刘广发, 任建林

黄如欣, 游攀, 张忠英, 厦门大学附属中山医院、厦门市临床检验中心 福建省厦门市 361004

陈长荣, 倪宏英, 厦门市中心血站 福建省厦门市 361004

刘广发, 厦门大学生命科学学院 福建省厦门市 361005

任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化病研究所 福建省厦门市 361005

通讯作者: 张忠英, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院、厦门市临床检验中心。

zhangzy@yahoo.com.cn

电话: 0592-8778328

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

Sensitive and resistant genetic factors related to colorectal cancer in patients from Xiamen

Ru-Xin Huang, Pan You, Chang-Rong Chen, Zhong-Ying Zhang, Hong-Ying Ni, Guang-Fa Liu, Jian-Lin Ren

Ru-Xin Huang, Pan You, Zhong-Ying Zhang, Xiamen Clinical Laboratory Center; the Affiliated Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Chang-Rong Chen, Hong-Ying Ni, Blood Center of Xiamen, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Guang-Fa Liu, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Jian-Lin Ren, Department of Internal Digestology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Xiamen University; Xiamen Institute of Digestive Disease, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Correspondence to: Zhong-Ying Zhang, Xiamen Clinical Laboratory, 201 Hubin South Road, Xiamen 361004, Fujian Province, China. zhangzy@yahoo.com.cn

Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To compare the gene frequencies of 15 STR loci between patients with colorectal cancer and healthy people from Xiamen in order to search for the genes that related to the colorectal cancer.

METHODS: The genotypes of the sample DNA were analyzed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) combined with 4-colored fluorescence-labeled method. All the polymorphic alleles of these 15 STR loci in the unrelated healthy locals and patients with colorectal cancer were investigated. The sensitive or resistant genetic factors were inferred according to the statistical difference in the distribution of allele frequencies.

RESULTS: There were statistical differences

between the healthy controls and patients with colorectal cancer in allele frequencies of the three loci: D5S818 (0.520 0 vs 0.219 5, $\chi^2 = 36.69$, $P < 0.01$; $RR = 3.852$ 1, $P < 0.05$), vWA (0.050 0 vs 0.292 7, $\chi^2 = 53.99$, $P < 0.01$; $RR = 0.127$ 2, $P < 0.05$), and FAG (0.09 vs 0.243 9, $\chi^2 = 37.58$, $P < 0.01$; $RR = 0.306$ 6, $P < 0.05$).

CONCLUSION: It is very possible that there is a sensitive gene for colorectal cancer near the area of D5S818-11 locus, and there are resistant genes for colorectal cancer near the region of vWA-15 and FAG-23 locus.

Key Words: colorectal cancer; Cancer susceptibility; Gene scanning

Huang RX, You P, Chen CR, Zhang ZY, Ni HY, Liu GF, Ren JL. Sensitive and resistant genetic factors related to colorectal cancer in patients from Xiamen. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):225-229

摘要

目的: 比较15个STR基因座基因频率在厦门地区大肠癌患者和正常人群中的分布, 推测与大肠癌相关的基因。

方法: 应用PCR复合扩增结合四色荧光检测方法对血样DNA进行基因型分析, 调查了本地区大肠癌患者人群和无关人群的基因频率分布, 并根据二者的该15个基因座等位基因频率分布的显著性差异, 推测易感连锁和抗性连锁的等位基因。

结果: 厦门地区大肠癌患者的D5S818(0.520 0 vs 0.219 5, $\chi^2 = 36.69$, $P < 0.01$; $RR = 3.852$ 1, $P < 0.05$)、vWA(0.050 0 vs 0.292 7, $\chi^2 = 53.99$, $P < 0.01$; $RR = 0.127$ 2, $P < 0.05$)和FAG(0.09 vs 0.243 9, $\chi^2 = 37.58$, $P < 0.01$; $RR = 0.306$ 6, $P < 0.05$)基因座的等位基因的分布与该地区健康人群有显著性差异, ($P < 0.01$)。B组超微结构改变明显, 而C组较B组超微结构有不同程度减轻。

结论: D5S818-11附近可能存在大肠癌易感基因; vWA-15、FAG-23附近有可能存在与大肠

■背景资料

随着人类基因组遗传图和物理图的逐步精细化, 以荧光标记、多重PCR、半自动化操作为特点的大规模全基因组扫描技术已成为当今疾病基因定位的主要工具。在肿瘤方面, 采用已知多态性微卫星进行基因扫描, 进而进行遗传连锁分析、连锁不平衡分析, 已初步筛选到一些可能的易感基因位点。

■研究前沿

近年来,人们逐渐意识到个体易感性在肿瘤发病机制中的重要性。国内外学者在多个层面研究了基因多态性与胃肠癌发生的相关性,阐明了基因型与表型之间的联系。本研究选择多态性较高的STR基因座,根据其在癌患者组与匹配对照组中出现频率是否存在显著性差异,推测易感基因。

癌相关的抗性基因。

关键词: 大肠肿瘤; 肿瘤易感性; 基因扫描

黄如欣, 游攀, 陈长荣, 张忠英, 倪宏英, 刘广发, 任建林. 厦门地区大肠癌人群某些遗传性易感因子和抗性因子的研究. 世界华人消化杂志 2006;14(2):225-229

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/225.asp>

0 引言

肿瘤已成为一类严重危害人类健康的疾病,其发病的主要原因是遗传和环境因素相互作用的结果。消化道肿瘤是发病率较高的恶性肿瘤,其发生与外界各种不良因素持续作用以及不同个体遗传易感性差异有关。按人类目前的知识水平尚难以攻克晚期恶性肿瘤,因此对肿瘤进行预防和早期诊治至关重要。这就需要从研究肿瘤的遗传易感性和易感基因入手。

我们收集了厦门地区无癌家族史的健康无关个体血液标本123份,厦门地区散发性大肠癌患者血液标本50份作为试验组,选择D3S1358、TH01、D21S11、D18S51、Penta E、D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、CSF1PO、Penta D、vWA、D8S1179、TPOX、FGA 15个多态性较高的STR基因座,采用基因扫描技术,应用PCR复合扩增结合四色荧光检测方法对血样DNA进行基因型分析。调查了本地区无癌家族史的健康人群和散发性大肠癌患者人群的基因频率分布,并根据二者的上述15个基因座等位基因频率分布的显著性差异,推测易感连锁和抗性连锁的等位基因。我们首次将该15个STR基因座应用于消化道肿瘤易感因子的研究,对易感基因的筛选作了有益的探索,为大肠癌易感因子的进一步定位克隆提供了一定的线索。

1 材料和方法

1.1 材料 123份血样采自本地区无癌家族史的健康无关个体,50份样本采自本地区散发性大肠癌患者。美国Promega公司PowerPlex 16 System试剂盒,PE公司5700荧光定量PCR仪、美国生物应用系统公司377DNA测序仪。

1.2 方法 用Chelex法提取DNA^[1],四色荧光PCR复合扩增,变性,电泳,片段分析、基因分型软件自动判断等位基因。

1.2.1 PCR扩增 参照PowerPlex 16 System PCR Amplification Kit User` Manual略做改进:在同一反应管中对上述15个基因位点进行复合扩增。

反应体系为25 μ L,其中PowerPlex16 10 \times Primer Pair Mix 2.5 μ L, *Taq* DNA聚合酶0.8 μ L, DNA模板2.5 μ L(0.5-1.0 ng)。扩增条件如下: 96 $^{\circ}$ C预热10 min,接着96 $^{\circ}$ C预变性1 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 经68 s变温到60 $^{\circ}$ C保持30 s, 经50 s变温到70 $^{\circ}$ C保持45 s, 进行10个循环, 再按90 $^{\circ}$ C 30 s经60 s变温到60 $^{\circ}$ C保持30 s, 经50 s变温到70 $^{\circ}$ C保持45 s进行20个循环,最后于60 $^{\circ}$ C延伸30 min。

1.2.2 扩增产物的电泳与检测 采用ABI377型基因分析仪自动进行电泳分离和基因检测, 扩增DNA片段大小由Genescan分析软件(版本为2.1)确定,再由Genotype(版本为2.5)分析命名 " 等位基因 "。

按 $RR=Pd(1-Pc)/Pc(1-Pd)$ 公式进行相对危险度分析并作统计学比较(RR :相对危险度; Pd :患者组基因频率; Pc :对照组基因频率), $RR>1$ 为有易感倾向, $RR<1$ 为有抗性倾向^[3,4]。找出各STR基因座与大肠癌相关基因的易感连锁或抗性连锁的等位基因。

统计学处理 用Microsoft Excel软件计算本地区健康人群和散发性大肠癌患者人群的基因频率。每个个体STR基因座应有2个等位基因检出,只检出1个者视为纯合子。如此计算出各等位基因的基因频率,并对健康人群的等位基因频率分布作Hardy Weinberg吻合度检验^[2]。

用行列皆无序卡方检验(χ^2 检验)分析本地区健康人群和散发性大肠癌患者人群的15个STR基因座等位基因的分布情况。以上分析在SPSS13.0统计软件平台上完成。

2 结果

2.1 厦门地区无关人群等位基因Hardy Weinberg 平衡分析 D3S1358、TH01、D21S11、D18S51、Penta E、D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、CSF1PO、Penta D、vWA、D8S1179、TPOX和FGA 15个基因位点在厦门地区无关人群中Hardy Weinberg 吻合度检验 $P>0.05$,说明这15个位点的分布符合Hardy-Weinberg平衡遗传定律。因此本研究选择的对照组具有群体代表性。

2.2 厦门地区大肠癌与15个STR基因座关联分析 这里只将具有统计学比较意义的基因座的频数分布表列出。表1-3分别表示厦门地区大肠癌患者人群和健康无关人群在D5S818、vWA和FAG STR基因座上的等位基因频数分布。

表 1 厦门地区肠癌人群和健康无关人群在D5S818基因座上的等位基因频数分布

人群类型	D5S818基因座的等位基因							合计	χ^2 值	P值
	7	9	10	11	12	13	14			
健康人群	7	22	54	54	60	46	3	246	36.69	<0.01
肠癌人群	0	3	11	52	14	20	0	100		
合计	7	25	65	106	74	66	3	346		

表 2 厦门地区肠癌人群和健康无关人群在vWA基因座上的等位基因频数分布

人群类型	vWA基因座的等位基因										合计	χ^2 值	P值
	7	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
健康人群	0	5	6	46	72	53	40	22	2	0	246	53.99	<0.01
肠癌人群	0	0	1	19	5	16	26	24	6	3	100		
合计	0	5	7	65	77	69	66	46	8	3	346		

表 3 厦门地区肠癌人群和健康无关人群在FAG基因座上的等位基因频数分布

人群类型	FAG基因座的等位基因																		合计	χ^2 值	P值
	16	18	19	20	20.2	21	21.2	22	23	23.2	24	24.2	25	25.2	26	26.2	27	28			
健康人群	0	4	13	18	0	31	0	58	60	0	25	0	33	0	1	2	0	1	246	53.99	<0.01
肠癌人群	2	2	5	7	1	14	1	23	9	2	15	1	13	2	3	0	0	0	100		
合计	2	6	18	25	1	45	1	81	69	2	40	1	46	2	4	2	0	1	346		

■创新盘点

本项研究首次将D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX和FGA等15个多态性较高的STR基因座应用于消化道肿瘤易感因子的研究,发现了D5S818-11附近可能存在肠癌易感基因; vWA-15附近有可能存在与大肠癌相关的抗性基因; FAG-23附近可能存在肠癌抗性基因。

因为 $P<0.01$, 所以可以认为D5S818基因座等位基因的分布与肠癌人群和健康人群之间相关联。肠癌人群与健康人群两组D5S818的等位基因分布有性差异($\chi^2=36.69, P<0.01$)。特别是在个别等位基因比较中, 肠癌人群D5S818-11的基因频率为0.520 0, 健康人群该等位基因的基因频率为0.219 5, 两者有统计学显著差异($P<0.01$); $RR=3.852\ 1, P<0.05$, 提示D5S818-11与肠癌相关联, 其附近可能存在肠癌易感基因(表1)。

因为 $P<0.01$, 所以可以认为vWA基因座等位基因的分布与肠癌人群和健康人群之间相关联。肠癌人群与健康人群两组vWA的等位基因分布有显著性差异($\chi^2=53.99, P<0.01$)。特别是在个别等位基因比较中, 肠癌人群vWA-15基因频率0.050 0, 明显低于健康人群vWA-15的基因频率0.292 7, 两者有统计学差异($P<0.01$)。 $RR=0.127\ 2, P<0.05$, 提示vWA-15与肠癌相关联, 其附近可能存在肠癌抗性基因(表2)。

因为 $P<0.01$, 所以可以认为FAG基因座等位基因的分布与肠癌人群和健康人群之间相关联。肠癌人群与健康人群两组FAG的等位基因分布有显著性差异($\chi^2=37.58, P<0.01$)。特别是在个别等位基因比较中, 肠癌人群FAG-23的基

因频率为0.09, 健康人群该等位基因的基因频率为0.243 9, 两者有统计学差异($P<0.01$)。 $RR=0.306\ 6, P<0.05$, 提示FAG-23与肠癌相关联, 其附近可能存在肠癌抗性基因(表3)。

3 讨论

自1990年代以来, 随着人类基因组遗传图和物理图的逐步精细化, 以荧光标记、多重PCR、半自动化操作为特点的大规模全基因组扫描技术已成为当今疾病基因定位的主要工具。在肿瘤方面, 采用已知多态性微卫星进行基因扫描, 进而进行遗传连锁分析、连锁不平衡分析, 已初步筛选到一些可能的易感基因位点。例如von Brevern *et al*^[5]对35位散发性食道鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)患者通过分析胛胝症食管癌基因(tylosis oesophageal cancer gene, TOC gene)附近的6个多态微卫星标记的杂合性缺失(LOH), 推测TOC基因是引起散发性食管癌发病的易感基因。

由于STR蕴含丰富多态性, 所以可用于基因作图、定向克隆、亲子鉴定、疾病机理的连锁分析以及肿瘤生物学、群体遗传学和进化生物学的研究^[6]。采用PCR技术, 基因扫描分型技术及自动分析系统, 选择多态性较高的STR基

■应用要点

本研究对易感基因的筛选作了有益的探索,为消化道肿瘤易感因子的进一步定位克隆提供了一定的线索,今后可对可疑基因的附近选择多个STR位点,进行全基因组扫描,做进一步深入分析。

因座对肿瘤患者进行研究已经得到科学家的认同.Yue *et al*^[7]利用PCR技术和高效液相色谱法(DHPLC)技术分析位于ECRG2基因外显子非编码区的多态性较高STR基因座后指出, ECRG2 STR可能是食道鳞状细胞癌(ESCC)的基因易感因子; Tseng *et al*^[8]利用STR、SNP等遗传标记推测表达N-氨基乙酸转甲基酶(Glycine N-methyltransferase, GNMT)的基因可能是肝癌的一个新的肿瘤易感基因; Zhang *et al*^[9]采用3色荧光标记的15个微卫星引物扩增相应的STR位点, PCR产物用PRISM377测序仪进行电泳及Genescan和Genotype软件分析,得出APC, MCC, CTNNA1和IL家族基因与结肠直肠癌发生密切相关的结论. Peng *et al*^[10]分析正常人和83例结肠直肠癌肿瘤患者的多态性微卫星基因座,发现正常人LOH频率和患者有显著差异.他们得出结论,散发性结肠直肠癌患者20号染色体有着显著的基因不稳定性,其变异与结肠直肠癌的发生密切相关.分析的微卫星标志愈多,与疾病相关的易感基因座的定位愈准确.在寻找肿瘤相关的易感基因座时,多采用间隔定位(interval mapping)法,即沿基因组逐一检验微卫星标志的位点与疾病某表型的位点呈连锁和不连锁机率的比值.该比值的对数称为优势对数分数"LOD"(log odd score).连锁信息以LOD值表示,一般以LOD值>2提示连锁,LOD值>3肯定连锁,LOD值<-2否定连锁^[11-13].

实验证明,采用基因扫描技术,结合遗传分析方法,有可能从癌症患者基因组中找出与肿瘤发病有关的等位基因.本研究选择D3S1358、THO1、D21S11、D18S51、Penta E、D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、CSF1PO、Penta D、vWA、D8S1179、TPOX及FGA 15个基因座,对消化道肿瘤患者进行基因型频率调查,进而根据癌症患者组与对照组中上述基因座的基因频率的显著性差异,从中筛查易感等位基因.有助于对相关基因的进一步定位克隆和深入研究,为探询消化道肿瘤病因及其防治研究提供有益的帮助.

STR基因型频率与人种(民族)的遗传背景关系明显,因此需先建立本地区健康人群的STR基因型频率的分布,进而根据当地癌症患者组与当地健康人群出现的STR基因型频率是否存在显著性差异,从而筛出易感基因.否则,结果有可能偏差,甚至相反. Arnett *et al*^[14]研究了20例具有抗心磷脂抗体(Auto-antibodies to phosphor lipids,

APA)类型的美国SLE患者,发现DQB1*0301可能是易感基因;而在江浙沪一带SLE患者中, DQB1*0301却可能是保护基因,结论正好相反.这证明,疾病与基因的遗传关联与人种(民族)的遗传背景关系明显.我们在对本地区消化道肿瘤患者进行基因扫描之前,先采集123例健康无关人群血样,对其进行DNA分型,建立了本地区必备的人群遗传背景,这是必不可少的基本环节.

D5S818位于染色体5q23.3-32,其核心序列为AGAT; vWA位于染色体12p12-pter,在人类假血友病因子基因(Human von Willebrand factor gene, HUMVWFA31)内,其核心序列为TCTA; FAG位于染色体4q28,在纤维蛋白原 α 链基因(Human fibrinogen alpha chain gene, HUMFIBRA)内,其核心序列为TTTC.所以在5、12、4号染色体上可能存在大肠癌的易感基因,今后可对可疑基因的附近选择多个STR位点,进行全基因组扫描,做进一步深入分析. SNP作为第三代图谱,与STR比较,它具有高密度、高稳定性和易于分型检测的优势,因而在疾病,特别是多基因疾病研究领域显示了巨大的优势.它在人类基因组中出现的频率非常高,平均每500-1 000个碱基对中就有一个SNP,估计其总数在300万个以上^[15].因此也可以根据肿瘤的一个或几个易感基因内或附近的SNP对患者人群与正常对照人群进行相关分析,确定某SNP的某种基因型、单倍型频率在患病人群与正常对照人群中的差异分布,从而确定某基因型或单倍型所反映的个体对某种肿瘤的易感性.

将基因多态性作为消化道肿瘤易感性的检测指标,可用于消化道肿瘤易感个体的一级预防以及进一步探索消化道肿瘤的发病机制.如果在某消化道肿瘤,例如胃癌高发地区和高危人群中广泛开展胃癌较特异的基因多态位点检测,然后进一步采取相关的预防措施,这样可有效降低人群中胃癌的患病率.同时,如何针对基因多态位点进行有效的基因治疗也是一个值得进一步研究的问题.

本课题对大肠癌易感基因和抗性基因进行了初步的探索.但是仅从这几个等位基因的有或无来推断是否会患大肠癌是较武断的.携带这些基因的人不一定会患大肠癌,而不携带这些基因的人也不一定就不会患大肠癌.其原因在于消化道细胞的癌变是多因素、多阶段及多基因联合作用的结果.不过我们发现

■名词解释

短串连重复序列(STR): STR又称为微卫星,他们的多态性又称为简单序列长度多态性. STR是第二代遗传标记,广泛分布于原核、真核生物基因组中.它存在于基因组的非编码区和染色体的近端粒区.由于核心序列重复数目的不同,因此在群体中呈现出遗传多态性.

D5S818-11, vWA-15和FAG-23位点, 作为消化道肿瘤易感性的检测指标, 将为消化道肿瘤易感个体的一级预防以及进一步深入探索消化道肿瘤的发病机制提供重要的线索。

4 参考文献

- 1 Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991; 10: 506-513
- 2 Wang W, Jia H, Wang Q, Cai Z, Wei L, Wang D, Bittles AH. STR polymorphisms of "forensic loci" in the northern Han Chinese population. *J Hum Genet* 2003; 48: 337-341
- 3 何清波, 苏炳华, 钱亢主编. 医学统计学及其软件包. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2002: 315-317
- 4 Maki P, Veijola J, Joukamaa M, Laara E, Hakko H, Jones PB, Isohanni M. Maternal separation at birth and schizophrenia-a long-term follow-up of the Finnish Christmas Seal Home Children. *Schizophr Res* 2003; 60: 13-19
- 5 von Brevern M, Hollstein MC, Risk JM, Garde J, Bennett WP, Harris CC, Muehlbauer KR, Field JK. Loss of heterozygosity in sporadic oesophageal tumors in the tylosis oesophageal cancer (TOC) gene region of chromosome 17q. *Oncogene* 1998; 17: 2101-2105
- 6 Koreth J, O'Leary JJ, O'D McGee J. Microsatellites and PCR genomic analysis. *J Pathol* 1996; 178: 239-248
- 7 Yue CM, Bi MX, Tan W, Deng DJ, Zhang XY, Guo LP, Lin DX, Lu SH. Short tandem repeat polymorphism in a novel esophageal cancer-related gene (ECRG2) implicates susceptibility to esophageal cancer in Chinese population. *Int J Cancer* 2004; 108: 232-236
- 8 Tseng TL, Shih YP, Huang YC, Wang CK, Chen PH, Chang JG, Yeh KT, Chen YM, Buetow KH. Genotypic and phenotypic characterization of a putative tumor susceptibility gene, GNMT, in liver cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 647-654
- 9 Zhang F, Zhou C, Ling Y, Qiu G, Bai S, Liu W, He L, Peng Z. Allelic analysis on chromosome 5 in sporadic colorectal cancer patients *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002; 24: 458-460
- 10 Peng Z, Zhou C, Zhang F, Ling Y, Tang H, Bai S, Liu W, Qiu G, He L. Loss of heterozygosity of chromosome 20 in sporadic colorectal cancer. *Chin Med J* 2002; 115: 1529-1532
- 11 项坤三. 糖尿病易感基因定位策略. *中华医学遗传学杂志* 1997; 14: 303-306
- 12 顾鸣敏, 陈仁彪. 多基因遗传的遗传分析的研究进展. *国外原子遗传学分册* 1998; 21: 60-65
- 13 Comuzzie AG, Allison DB. The search for human obesity genes. *Science* 1998; 280: 1374-1377
- 14 Arnett FC, Olsen ML, Anderson KL, Reveille JD. Molecular analysis of major histocompatibility complex alleles associated with the lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1991; 87: 1490-1495
- 15 Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 308-311

■同行评价

本研究将为消化道肿瘤易感个体的一级预防以及进一步深入探索消化道肿瘤的发病机制提供一定的线索。

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 邀请本刊编委为专栏撰稿, 每期1-3个专家门诊。写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

经内镜乳头括约肌切开术与气囊扩张术治疗胆总管结石临床评价

李春明, 刘中宏, 姜国玲, 张兆文

■背景资料

内镜下乳头括约肌切开术(EST)治疗胆总管结石已有30 a的历史, 随着内镜技术的发展而日益成熟。然而, 这项技术因为需要进行乳头切开而存在着较高的并发症风险。随后发展起来的乳头括约肌气囊扩张术(EPBD)不需要进行乳头切开, 而是采用柱状气囊进行乳头扩张, 使括约肌松弛, 乳头开口扩大从而进行胆管取石。近年来国内外内镜学家对上述两种方法的适应证、疗效及其并发症进行了大量的临床观察, 然而EPBD能否达到与EST同样的取石效果, 并且具有保护乳头括约肌功能从而减少并发症的优点仍然受到人们的关注。

李春明, 刘中宏, 姜国玲, 张兆文, 哈尔滨市第一医院消化内科, 黑龙江省哈尔滨市 150010

哈尔滨市科技局科技攻关项目, No. 2004AA9CS196-17

通讯作者: 李春明, 150010, 黑龙江省哈尔滨市道里区地段街151号, 哈尔滨市第一医院消化内科。

电话: 0451-84883115

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-08

Clinical evaluation of endoscopic sphincterotomy and papillary balloon dilation for removal of common bile duct stones

Chun-Ming Li, Zhong-Hong Liu, Guo-Ling Jiang, Zhao-Wen Zhang

Chun-Ming Li, Zhong-Hong Liu, Guo-Ling Jiang, Zhao-Wen Zhang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Harbin, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China

Supported by the Key Programs of Science and Technology Commission of Harbin, No. 2004AA9CS196-17

Correspondence to: Chun-Ming Li, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Harbin, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China.

Received: 2005-11-23 Accepted: 2005-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the clinical effect of endoscopic sphincterotomy (EST) and endoscopic papillary balloon dilatation (EPBD) associated with mechanical lithotripsy (EML) in the treatment of common bile duct stones.

METHODS: Sixty patients with common bile duct stones were enrolled and randomized to EST ($n = 30$) and EPBD ($n = 30$) group. EST or EPBD associated with mechanical lithotripsy were performed in the corresponding group. The success rates for duct clearance as well as the frequency of short-term and long-term complications were evaluated.

RESULTS: Duct clearance was achieved in 93.3% patients of EST group and 90% of EPBD group, and there was no significant difference between them ($P > 0.05$). Short-term complica-

tions, including acute pancreatitis, cholangitis and hemorrhage, appeared in 30% and 13.3% patients of EST and EPBD group, respectively, and there was no significant difference between them, either ($P > 0.05$). However, the rates of long-term complications such as cholangitis and recurrent choledocholithiasis were 26.7% and 3.3% in EST and EPBD group, between which significantly difference existed ($P < 0.05$).

CONCLUSION: EST and EPBD were approximately equal in terms of successful clearance of bile duct stones and short-term complications, but EPBD is more superior in the prevention of long-term complication, indicating that EPBD can protect the papillary function to some extent.

Key Words: Endoscopic sphincterotomy; Endoscopic papillary balloon dilatation; Common bile duct stone; Complication

Li CM, Liu ZH, Jiang GL, Zhang ZW. Clinical evaluation of endoscopic sphincterotomy and papillary balloon dilation for removal of common bile duct stones. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):230-233

摘要

目的: 评价经内镜乳头括约肌切开术(EST)和气囊扩张术(EPBD)联合机械碎石(EML)治疗胆总管结石的临床疗效。

方法: 选取我院住院胆总管结石患者60例, 随机分成EST组($n = 30$)和EPBD组($n = 30$), 分别采用EST和EPBD联合机械碎石进行内镜下取石。观察二组的治愈率, 近期并发症、远期并发症。

结果: 正结果EST组与EPBD组的取石成功率为93.3%和90%。无显著性差异($P > 0.05$); 两组近期并发症发生率(包括胰腺炎、胆道感染、出血)为30%和13.3%, 无显著性差异($P > 0.05$); 而远期并发症(包括胆道感染、结石复发)26.7%和3.3%, 有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: EST和EPBD的结石清除率及近期并发

症相似, 但EPBD远期并发症的发病率较低, 表明EPBD能够在一定程度上保护Oddi括约肌功能。

关键词: 内镜乳头括约肌切开术; 气囊扩张术; 胆总管结石; 并发症

李春明, 刘中宏, 姜国玲, 张兆文. 经内镜乳头括约肌切开术与气囊扩张术治疗胆总管结石临床评价. 世界华人消化杂志 2006;14(2):230-233

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/230.asp>

0 引言

近30 a来, 内镜技术在国内外得到了迅猛的发展, 在肝、胆、胰疾病的诊断和治疗方面日益发挥着重要作用. 内镜下乳头括约肌切开术(EST)和乳头括约肌气囊扩张术(EPBD)两种技术是目前国内外治疗胆总管结石最先进的微创技术. 近年来国内外内镜学家对上述两种方法的适应证、疗效及其并发症进行了大量的临床观察, 然而EPBD能否具有很好的取石效果并且具有保护乳头括约肌功能的优点仍然受到人们的关注。

1 材料和方法

1.1 材料 选取我院2002/2004住院的胆总管结石患者60例, 随机分成二组, 即: EST组($n = 30$)和EPBD组($n = 30$), 二组患者基本情况包括年龄、结石大小、数量经统计学 t 检验处理, 无显著性差异($P > 0.05$)(表1)。

1.2 方法 分别采用EST和EPBD联合机械碎石进行治疗. EST采用日本OLYMPUS拉式切开刀, EPBD采用Wilson-Cook生产气囊扩张导管, 分别以4, 6, 8 mm外径逐级扩张乳头括约肌, 最大压力400 kPa, 每次45-60 s. 机械碎石采用日本OLYMPUS BML-4Q机械碎石器. 二组均采用取石网篮, 取石气囊取石, 根据结石大小采用或不采用机械碎石器. 为预防术后胰腺炎的发生, 我们对部分患者采取预防性胰管支架置入。

结石全部取出, 酶学指标恢复正常为治愈; 1 wk内出现的并发症为近期并发症, 1 a内出现的并发症为远期并发症. 近期并发症包括: 胰腺炎、出血和穿孔、胆道感染、结石嵌顿等. 随访1 a中出现的远期并发症包括: 结石复发、胆道感染。

统计学处理 通过相互对照, 对两组的治愈率、近远期并发症发生率进行统计学分析. 所

表 1 二组患者基本情况统计表 (mean \pm SD)

	n	年龄	男女 比	结石大小 (mm)	结石数量
EST组	30	55.2 \pm 27.4	1.49	10 \pm 4.9	1.5 \pm 1.2
EPBD组	30	54.5 \pm 28.0	1.33	10 \pm 4.2	1.4 \pm 1.1

表 2 EST与EPBD疗效、近期并发症对照分析表 n (%)

	成功率	胰腺炎	胆道感染	出血	合计
EST	28 (93.3)	2 (6.7)	2 (6.7)	5 (16.7)	9
EPBD	27 (90)	3 (10)	1 (3.3)	0	4

有数据采用SAS统计软件进行方差分析、 t 检验或 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 二组取石成功率、近期并发症对照分析 EST和EPBD二组取石成功率分别为93.3%、90%, 无显著性差异($\chi^2 = 0$, $P > 0.05$). 其中失败者EST组有2例, EPBD组有3例, 是由于选择性胆管插管失败或超过2枚的较大结石以及高龄不耐受者, 给予胆道支架引流术(ERBD)结束操作, 而不是由于取石失败. 术后轻型胰腺炎EST组2例, EPBD组3例. EPBD组有3例15 mm以上较大结石患者, 为防止术后胰腺炎的发生, 我们采取预防性胰管支架置入, 采用7F单猪尾型不带倒刺支架, 以便患者进食后可以自行脱落. 上述3例无并发症发生, 因例数较少, EPBD后预防性的支架置入能否减少术后胰腺炎的发生还有待于进一步研究. 胆道感染EST组2例, EPBD组1例. 经过抗炎、胃肠减压治疗后症状缓解. 出血EST组发生5例, 经局部喷洒去甲肾上腺素冰盐水及/或气囊导管压迫后止血, 而EPBD组因为不需要乳头切开无出血发生. 穿孔、结石嵌顿二组均未出现. 合计EST组近期并发症9例(30%), EPBD组4例(13.3%), 经 χ^2 检验无显著性差异($\chi^2 = 2.45$, $P > 0.05$)(表2)。

2.2 远期并发症对照分析 我们对二组患者进行了1 a的跟踪随访, 发现胆道感染EST组5例(16.7%), EPBD组1例(3.3%), 结石复发EST组3例(10%), EPBD组无结石复发出现, 合计远期并发症发生率EST组8例(26.7%), EPBD组1例(3.3%), 经 χ^2 检验有显著性差异($\chi^2 = 4.71$, $P < 0.05$)。

结果二组的取石成功率、近期并发症无显著性差异; 而远期并发症的发生率有显著性差异。

■研发前沿

近年来国内一些学者也进行了关于EST及EPBD成功率、并发症方面的研究, 但多为EST、EPBD的疗效观察。

■创新盘点

不同于以往的研究, 本实验将EST与EPBD联合机械碎石进行对照分析, 全面的评估两者的治愈率、近期、远期并发症发生率, 具有一定的科研价值及临床指导意义。

■应用要点

EPBD对于较大的结石疗效不如EST, 甚至比较困难, 然而EPBD联合机械碎石治疗较大的结石取得了良好的效果, 而且具有保护乳头括约肌功能从而减少远期并发症的优点, 尤其对于有出血倾向者、年龄较轻患者需要保留Oddi括约肌功能者以及毕氏Ⅱ式胃切除患者更为重要, 具有广阔的应用前景。

3 讨论

3.1 传统的适应证受到挑战 内镜下乳头括约肌切开术(EST)是最早用于内镜下治疗胆总管结石的技术。1974年由Classen和Demling应用拉式切开刀进行乳头切开, 并公开发表了这一成果^[1]。随着内镜技术的发展, 该项技术日益成熟, 配合预切开术(Pre-cut)、开窗术(fistulostomy)、机械碎石(EML)等技术, 使得成功率不断提高。乳头括约肌气囊扩张术(EPBD)是1990年代开展的一项技术, EPBD是采用柱状气囊进行乳头扩张, 使括约肌松弛、乳头开口扩大从而进行胆管取石。一般认为适用于结石较小(<10 mm), 一些EST禁忌患者, 如有出血倾向者、年龄较轻需要保留Oddi括约肌功能者以及毕氏Ⅱ式胃切除患者^[2,3]。

Natsui *et al*^[4]在一项140例胆总管结石患者EST、EPBD的研究中, 结果发现小结石(<10 mm)取石的次数EPBD与EST近似; 然而对于较大的结石EPBD明显高于EST(2.4 *vs* 1.6, $P<0.01$)。从并发症来看, 出血的发生率EPBD小于EST, 胰腺炎、结石的再发生率两者近似。因此得出结论: EPBD能否成为一种常规的内镜下治疗方法还有待于进一步研究。Arnold *et al*^[5]在一项有60例胆总管结石患者的研究中, EST或EPBD后均以网篮及/或气囊导管取石。取石的成功率EST、EPBD分别为100%, 77%($P<0.01$), 而未清除的部分病例经EST结石全部清除; 操作持续时间分别为 17 ± 12 min, 29 ± 15 min($P>0.05$); WHO分级2-4级的并发症如胰腺炎、胆囊炎、出血等EST低于EPBD。因此得出结论EST优于EPBD。

由此可见, EPBD对于较大的结石疗效不如EST, 甚至比较困难, 然而EPBD联合其他手段治疗较大的结石取得了良好的效果。Yasuda *et al*^[6]在一项40例患者患有较大胆总管结石(12 mm或更大)的前瞻性随机实验中, 采用机械碎石, 结石清除成功率为100%。Minami *et al*^[7]对35例胆总管结石患者联合应用EPBD、机械碎石和硝酸异山梨酯从33例(94%)中取出多枚较大结石。日本学者Fujita *et al*^[8]随机将282例胆总管结石患者(直径<14 mm)分为2组, EST组和EPBD组, 必要时均可采用机械碎石。两组在结石完全清除率、操作时间、操作次数、碎石术的使用, 并发症的发生率、死亡率以及6 mo内胆系症状的发生上均无显著差异。只有轻型胰腺炎的发生率EPBD组较EST组高, 分别为9%和2%。另一项

研究表明, 预防性放置胰管支架可以减少EPBD胰腺炎的发生^[9]。从以上结果可以看出, EPBD联合其他手段如机械碎石能够达到与EST相似的治疗效果。

3.2 EPBD能够在一定程度上保护乳头括约肌功能 Sato *et al*^[10]通过内镜压力测量法来观察EPBD后1 wk, 1 mo Oddi括约肌功能改变, 1 wk后明显降低, 1 mo后部分恢复, 认为需要更长时间的观察。Yasuda *et al*^[11]将70名胆总管结石患者分为EST组和EPBD组, 采用内镜测压法在术前、术后1 wk, 1 a测量Oddi括约肌功能。结果两组各35例均取石成功, 1 wk后Oddi括约肌功能均受到损害, EST组较重。1 a以后Oddi括约肌功能EST组较EPBD组明显降低。从而证明EPBD较EST能有效地保护Oddi括约肌功能。

这种保护作用能够减少远期并发症的发生, 其中包括伴有胆囊结石的患者发生急性胆囊炎。Ochi *et al*^[12]在一项110例EST、EPBD的对照研究中发现两组胆管清除率(92.7% *vs* 98.1%)和近期死亡率(2% *vs* 5.6%)没有统计学差异。长期随访23 mo发现EST组有胆囊结石的患者急性胆囊炎的发生率较高($P=0.03$)。内镜测压显示仅在EPBD后存在胆管、十二指肠压力梯度, 这表明保护乳头功能可以降低伴有胆囊结石的患者发生急性胆囊炎的风险。Sugiyama *et al*^[13]的研究也得出了相同的结论。

EST远期并发症的报道正逐渐增多, 一些研究结果表明胆总管结石复发率为1-24%^[14,15-19], 这些复发是因为十二指肠胆管返流引起的感染有关。EST术后有60-100%发生胆道细菌感染^[18,20]。EST术后狭窄导致胆道引流不畅或胆汁淤积是胆道症状复发的重要原因, EST术后乳头括约肌狭窄发生率为0.5-6.8%^[20], 通常发生在EST术后1 a^[14,15,17,21,22], 乳头括约肌切开不充分可能是EST术后狭窄的一个风险因子^[23]。在无胆道梗阻且已行EST的情况下发生的胆管炎称为sine materia胆管炎, 其发生率为1.9-3.4%^[17,19]。

当然, 这些并发症的发生是否仅仅因为乳头括约肌功能丧失还有待于进一步研究。

总之, 综合国内外的其他研究结果以及本结果, 我们认为在结石较大的情况下, 单一采用EPBD后使用网篮、气囊导管取石不仅成功率低, 而且容易损伤乳头括约肌产生并发症。而EPBD联合机械碎石, 以及预防性的胰管支架置入可解决这一技术难题, 达到具有较高治愈率、并发症少, 并且能够保护乳头括约肌功能

治疗效果. 尤其对于40岁以下的患者, 这种保护作用能够减少远期并发症的发生, 其中包括结石再发生、胆囊炎、胆道细菌感染、乳头括约肌狭窄以及sine materia胆管炎等.

4 参考文献

- 1 Classen M, Demling L. Endoscopic sphincterotomy of the papilla of Vater and extraction of stones from the choledochal duct (author's transl). *Dtsch Med Wochenschr* 1974; 99: 496-497
- 2 Huibregtse K. Biliary sphincter balloon dilation; who, when and how? *Can J Gastroenterol* 1999; 13: 499-500
- 3 Costamagna G. ERCP and endoscopic sphincterotomy in Billroth II patients: a demanding technique for experts only? *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: 306-309
- 4 Natsui M, Narisawa R, Motoyama H, Hayashi S, Seki K, Wakabayashi H, Itoh S, Asakura H. What is an appropriate indication for endoscopic papillary balloon dilation? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 635-640
- 5 Arnold JC, Benz C, Martin WR, Adamek HE, Riemann JF. Endoscopic papillary balloon dilation vs. sphincterotomy for removal of common bile duct stones: a prospective randomized pilot study. *Endoscopy* 2001; 33: 563-567
- 6 Yasuda I, Tomita E, Moriwaki H, Kato T, Wakahara T, Sugihara J, Nagura K, Nishigaki Y, Sugiyama A, Enya M. Endoscopic papillary balloon dilatation for common bile duct stones: efficacy of combination with extracorporeal shockwave lithotripsy for large stones. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 1045-1050
- 7 Minami A, Maeta T, Kohi F, Nakatsu T, Morshed SA, Nishioka M. Endoscopic papillary dilation by balloon and isosorbide dinitrate drip infusion for removing bile duct stone. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 765-768
- 8 Fujita N, Maguchi H, Komatsu Y, Yasuda I, Hasebe O, Igarashi Y, Murakami A, Mukai H, Fujii T, Yamao K, Maeshiro K. Endoscopic sphincterotomy and endoscopic papillary balloon dilatation for bile duct stones: A prospective randomized controlled multicenter trial. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 151-155
- 9 Aizawa T, Ueno N. Stent placement in the pancreatic duct prevents pancreatitis after endoscopic sphincter dilation for removal of bile duct stones. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 209-213
- 10 Sato H, Kodama T, Takaaki J, Tatsumi Y, Maeda T, Fujita S, Fukui Y, Ogasawara H, Mitsufuji S. Endoscopic papillary balloon dilatation may preserve sphincter of Oddi function after common bile duct stone management: evaluation from the viewpoint of endoscopic manometry. *Gut* 1997; 41: 541-544
- 11 Yasuda I, Tomita E, Enya M, Kato T, Moriwaki H. Can endoscopic papillary balloon dilation really preserve sphincter of Oddi function? *Gut* 2001; 49: 686-691
- 12 Ochi Y, Mukawa K, Kiyosawa K, Akamatsu T. Comparing the treatment outcomes of endoscopic papillary dilation and endoscopic sphincterotomy for removal of bile duct stones. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 90-96
- 13 Sugiyama M, Atomi Y. Does endoscopic papillary balloon dilation affect gallbladder motility? *Gastrointest Endosc* 1999; 50: 74-78
- 14 Pereira-Lima JC, Jakobs R, Winter UH, Benz C, Martin WR, Adamek HE, Riemann JF. Long-term results (7 to 10 years) of endoscopic papillotomy for choledocholithiasis. Multivariate analysis of prognostic factors for the recurrence of biliary symptoms. *Gastrointest Endosc* 1998; 48: 457-464
- 15 Hammarstrom LE, Holmin T, Stridbeck H. Endoscopic treatment of bile duct calculi in patients with gallbladder *in situ*: long-term outcome and factors. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 294-301
- 16 Ikeda S, Tanaka M, Matsumoto S, Yoshimoto H, Itoh H. Endoscopic sphincterotomy: long-term results in 408 patients with complete follow-up. *Endoscopy* 1988; 20: 13-17
- 17 Hawes RH, Cotton PB, Vallon AG. Follow-up 6 to 11 years after duodenoscopic sphincterotomy for stones in patients with prior cholecystectomy. *Gastroenterology* 1990; 98: 1008-1012
- 18 Tanaka M, Takahata S, Konomi H, Matsunaga H, Yokohata K, Takeda T, Utsunomiya N, Ikeda S. Long-term consequence of endoscopic sphincterotomy for bile duct stones. *Gastrointest Endosc* 1998; 48: 465-469
- 19 Prat F, Malak NA, Pelletier G, Buffet C, Fritsch J, Choury AD, Altman C, Liguory C, Etienne JP. Biliary symptoms and complications more than 8 years after endoscopic sphincterotomy for choledocholithiasis. *Gastroenterology* 1996; 110: 894-899
- 20 Frimberger E. Long-term sequelae of endoscopic papillotomy. *Endoscopy* 1998; 30: A221-A227
- 21 Escourrou J, Cordova JA, Lazorthes F, Frexinos J, Ribet A. Early and late complications after endoscopic sphincterotomy for biliary lithiasis with and without the gall bladder '*in situ*'. *Gut* 1984; 25: 598-602
- 22 Sugiyama M, Atomi Y. Follow-up of more than 10 years after endoscopic sphincterotomy for choledocholithiasis in young patients. *Br J Surg* 1998; 85: 917-921
- 23 Geenen JE, Toouli J, Hogan WJ, Dodds WJ, Stewart ET, Mavrelis P, Riedel D, Venu R. Endoscopic sphincterotomy: follow-up evaluation of effects on the sphincter of Oddi. *Gastroenterology* 1984; 87: 754-758

■同行评价

本文将EST与EPBD联合机械碎石进行对照分析, 全面的评估两者的治愈率、近期、远期并发症发生率, 有独到见解, 对于临床工作具有一定的指导意义.

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

视黄醇脂对慢性酒精性肝病患者肝脏纤维化的抑制作用

刘中宏, 郑长青, 李春明

■背景资料

肝纤维化是多种慢性肝损伤的不良结局, 进一步发展可发展成肝硬化, 严重影响人们的生活质量。随着我国人民生活质量的提高, 由于饮酒所造成的肝纤维化日益增多。目前肝纤维化的药物治疗种类有限, 且处于探讨阶段, 有些药物如秋水仙碱, 皮质类固醇副作用较大, 因此有必要找到一种安全、有效的抗肝纤维化的药物。

刘中宏, 郑长青, 中国医科大学附属二院消化内科 辽宁省沈阳市 110004

李春明, 哈尔滨市第一医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150010

通讯作者: 刘中宏, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院消化内科。

liuzhonghong@medmail.com.cn

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-08

Effect of vitamin A on hepatic cirrhosis in patients with chronic alcoholic liver disease

Zhong-Hong Liu, Chang-Qing Zheng, Chun-Ming Li

Zhong-Hong, Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Chun-Ming Li, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Harbin, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Zhong-Hong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. liuzhonghong@medmail.com.cn

Received: 2005-11-23 Accepted: 2005-12-08

Abstract

AIM: To prove the inhibitory effect of vitamin A (Vit A) on the formation of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease (ALD).

METHODS: Fifty patients were assigned into Vit A and Huguang treatment group (controls). After corresponding treatment for 6, 12 and 18 mo, the levels of serum procollagen III peptide (PIII P) and hyaluronic acid (HA) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: After 18 mo of the Vit A treatment, the levels of PIII P ($16.9 \pm 6.8 \mu\text{g/L}$ vs $28.2 \pm 9.7 \mu\text{g/L}$) and HA ($132.3 \pm 71 \mu\text{g/L}$ vs $210.0 \pm 87 \mu\text{g/L}$) were significantly decreased as compared with those before the treatment (both $P < 0.01$), and there was also significant difference between the treatment group and the control group (PIII P: $16.9 \pm 6.8 \mu\text{g/L}$ vs $23.6 \pm 9.6 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$; HA: $132.3 \pm 71 \mu\text{g/L}$ vs $192.0 \pm 97 \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Vit A can suppress hepatic fibrogenesis of ALD patients, and the mechanism may be related to its inhibition on the release of collagen.

Key Words: Vitamin A; Collagen; Procollagen III peptide; Hyaluronic acid

LIU ZH, Zheng CQ, Li CM. Effect of vitamin A on hepatic cirrhosis in patients with chronic alcoholic liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):234-237

摘要

目的: 证明维生素A(Vit A)对慢性酒精性肝病(ALD)患者的肝脏纤维化形成有抑制作用, 为肝纤维化的治疗提供一条简便有效的新途径。

方法: 选择58例ALD患者, 采用临床观察的方法, 通过外源性的给予Vit A, 以酶联免疫吸附法检查ALD患者血清Ⅲ型前胶原肽(PⅢP)及血清透明质酸(HA)的变化。

结果: Vit A可以降低ALD患者血清Ⅲ型前胶原肽及血清透明质酸水平。Vit A治疗后18 mo, 血清Ⅲ型前胶原肽($16.9 \pm 6.8 \mu\text{g/L}$ vs $28.2 \pm 9.7 \mu\text{g/L}$)及透明质酸($132.3 \pm 71 \mu\text{g/L}$ vs $210.0 \pm 87 \mu\text{g/L}$)水平均较治疗前显著降低(均 $P < 0.01$), 且较对照组也有显著降低(PⅢP: $16.9 \pm 6.8 \mu\text{g/L}$ vs $23.6 \pm 9.6 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$; HA: $132.3 \pm 71 \mu\text{g/L}$ vs $192.0 \pm 97 \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$)。

结论: Vit A可以抑制ALD患者肝脏纤维化的形成, 其机制可能是Vit A参与肝星状细胞(HSC)的代谢, 从而抑制胶原的释放。

关键词: 视黄醇脂; 胶原; 血清Ⅲ型前胶原肽; 血清透明质酸

刘中宏, 郑长青, 李春明. 视黄醇脂对慢性酒精性肝病患者肝脏纤维化的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2006;14(2):234-237
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/234.asp>

0 引言

肝纤维化是多种慢性肝损伤的不良结局, 进一步发展可形成肝硬化。目前肝纤维化的药物治

疗种类有限, 且处于探讨阶段, 有些药物如秋水仙碱、皮质类固醇等药物副作用较大. Vit A参与肝星状细胞(HSC)的代谢进而影响肝脏纤维化形成方面的研究日益受到人们的重视. 故探明Vit A与肝脏纤维化的关系可为肝纤维化的治疗提供一条简便有效的新途径.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2002-01/2004-01的住院及门诊患者中慢性酒精性肝病(ALD)患者58例. 均为男性患者, 年龄35-76岁, 饮酒量在40-80 g/d, 5-10 a. 诊断标准参考吴晶新临床诊断标准^[1]. 随机分成二组: 对照组26例, 治疗组32例. 各组的年龄及饮酒量无显著性差异.

1.2 方法 对照组给予护肝片, 治疗组给予Vit A, 每日25 000单位治疗. 二组分别于试验前和后6、12、18分别测定血清Ⅲ型前胶原肽(PⅢP)和血清透明质酸(HA), 进行用药前后的自身对照以及组间对照. 观察期间嘱患者严格戒酒, 如不能严格戒酒者为剔除病例.

血清Ⅲ型前胶原肽(PⅢP)及血清透明质酸(HA)测定方法: 采用上海海研医学生物技术中心试剂盒, 酶联免疫吸附法.

统计学处理 所有数据采用SAS统计软件进行方差分析、*t*检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

药物组及对照组血清PⅢP治疗前的水平分别为 $28.2 \pm 9.7 \mu\text{g/L}$ 和 $25.1 \pm 10.2 \mu\text{g/L}$, 两组间无差异, 而治疗后18 mo分别为 $16.9 \pm 6.8 \mu\text{g/L}$ 和 $23.6 \pm 9.6 \mu\text{g/L}$, 差异显著($P < 0.01$), 药物组治疗前后行自身对照, 差异显著($P < 0.01$), 而对照组治疗前后行自身对照, 无差异(表1).

药物组及对照组血清HA治疗前的水平分别为 $210.0 \pm 87 \mu\text{g/L}$ 和 $198.4 \pm 92 \mu\text{g/L}$, 两组间无差异, 而治疗后18 mo分别为 $132.3 \pm 71 \mu\text{g/L}$ 和 $192.0 \pm 97 \mu\text{g/L}$, 差异显著($P < 0.05$), 药物组治疗前后行自身对照, 有明显下降($P < 0.01$), 对照组行自身对照, 无差异(表2).

3 讨论

3.1 肝纤维化治疗现状 肝硬化目前的治疗现状不容乐观, 为解决这一难题国内外学者进行了大量研究, 但目前的药物治疗如秋水仙碱、干扰素、皮质类固醇、前列腺素E类似物等等均处于探索阶段, 国内学者李定国*et al*^[2]对汉防己甲素

进行了研究, 结果发现该物质能明显抑制细胞内DNA及胶原合成, 但将Vit A应用于ALD的临床治疗方面的研究国内未见报道.

3.2 血清Ⅲ型前胶原肽(PⅢP)、透明质酸(HA)与肝脏纤维化 长期以来, 肝脏纤维化的诊断依赖肝脏组织检查. 虽然有人报道测定单胺氧化酶、氨基葡萄糖苷酶、脯氨酸及游离羟脯氨酸等也有助于肝脏纤维化的诊断, 但因敏感度或特异性较差, 逐步被淘汰. 近年来, 国内外大量研究表明PⅢP能可靠地反映肝脏纤维化的程度和活动性, 是观察抗肝脏纤维化的指标^[3]. 胶原蛋白在肝纤维化时可增加至50%左右, 其中以I型和Ⅲ型为主, 在肝纤维化过程中I型、Ⅲ型胶原是肝纤维间隔的重要来源, 新形成的I型、Ⅲ型胶原形成纤维束, 并沿这些细胞呈树枝状分布, 形成新的纤维间隔. 另外, 成熟的I型、Ⅲ型胶原由于细胞变性、坏死所致的网状纤维支架的塌陷加重了肝纤维化^[4]. 透明质酸(HA)是含有大量多糖的大分子物质, 在肝纤维化活动期, 血清中含量最多的是HA, HA可加速胶原蛋白聚合成前胶原纤维的横纹周期, 并能影响到前胶原的粗细, 促进胶原蛋白分子的聚合过程. HA对HSC细胞有激活作用, 表现为HSC细胞骨架蛋白增加及胶原合成增加. 因此, HA可以反映肝脏的损伤程度和肝纤维化的发展变化^[5], 并发现HA升高的幅度与肝脏纤维化改变程度呈正相关^[6].

3.3 Vit A对肝脏纤维化的影响 肝脏纤维化的实质是由于胶原和其他细胞外基质(ECM)的合成与降解失衡, 导致在肝内过量沉积. 在肝硬化时, ECM合成大于降解, 并在肝内过量沉积, 其中I型胶原增加8-10倍, Ⅲ型胶原增加3-4倍, 而Ⅳ型胶原增多达50倍, 其他各种糖蛋白(LN、FN)、蛋白多糖(PG)增多达10-20倍.

细胞外基质(ECM)成分主要来源于肝星状细胞(HSC), 而HSC又在机体Vit A储存和代谢中起着重要作用. Vit A即视黄醇, 视黄醇脂是Vit A在体内的代谢衍生物, 正常情况下, 肝脏储存80%以上的Vit A类, 而其中80%甚至90%以上的Vit A类以视黄醇脂的形式储存于HSC中, Vit A与HSC的关系日益受到重视, 国外大量资料表明其关系密切. 肝纤维化时肝内及HSC内Vit A类含量下降^[7], 缺乏Vit A可以促进肝纤维化, 细胞因子和化学因子收缩性增加^[8], 其中以 α -平滑肌肌动蛋白显著增殖, 合成大量ECM为特征^[9]. 目前认为HSC是肝纤维化时ECM的最主要的来源细胞, 他的活化是肝纤维化发生的关键. 而Vit A类可阻

■创新盘点

本文证明维生素A对慢性酒精性肝病患者的肝脏纤维化形成有抑制作用, 为肝纤维化的治疗提供一条简便有效的新途径.

■名词解释

视黄醇脂: Vit A在体内的代谢衍生物, 正常情况下, 肝脏储存有机体内80%以上的Vit A类, 主要以视黄醇脂的形式储存于肝星状细胞中。

表1 治疗前后血清Ⅲ型前胶原肽(PⅢP) (mean ± SD, μg/L)

组别	治疗前	治疗后 (mo)		
		6	12	18
药物组	28.2 ± 9.7 (n = 32)	27.6 ± 9.1 (n = 30)	22.1 ± 9.9 (n = 27)	16.9 ± 6.8 ^{bd} (n = 24)
对照组	25.1 ± 10.2 (n = 26)	24.6 ± 9.8 (n = 25)	24.1 ± 11.0 (n = 23)	23.6 ± 9.6 (n = 20)

治疗后^d*P* < 0.01 vs 对照组; 药物组治疗后^b*P* < 0.01 vs 治疗前。

表2 治疗前后血清透明质酸(HA) (mean ± SD, μg/L)

组别	治疗前	治疗后 (mo)		
		6	12	18
药物组	210.0 ± 87 (n = 32)	201.2 ± 68 (n = 30)	167.6 ± 83 (n = 27)	132.3 ± 71 ^{ab} (n = 24)
对照组	198.4 ± 92 (n = 26)	190.2 ± 89 (n = 25)	188.3 ± 97 (n = 23)	192.0 ± 97 (n = 20)

治疗后^a*P* < 0.05 vs 对照组; 药物组治疗后^b*P* < 0.01 vs 治疗前。

止肝纤维化的形成, 体外研究^[10,11]也表明, 激活的HSC内Vit A类含量降低, 补充外源性Vit A类可使HSC获得Vit A类, 抑制其增殖、激活而降低ECM的产生。

HSC最初于1876年由kuffer采用氯化金染色方法首次发现, 以后的大量研究发现HSC不论在正常肝脏, 还是在纤维化的肝脏与胶原代谢关系密切。荧光显微镜和化学分析都证实了在慢性肝病、肝硬化患者的肝脏中Vit A的总量下降。

故我们有理由认为储存Vit A与HSC合成胶原呈负相关。其机制可能是由于Vit A以脂滴的形式占据了细胞质的空间, 使其他细胞器的活动受到限制, 因而纤维的合成与分泌受到限制。目前对HSC激活的调控及生物学效应的研究很多, 当肝脏受到理化及生物因素刺激时, 肝星状细胞失去类维生素A, 旺盛增殖, 合成和分泌大量的细胞外基质(ECM)成分, 如胶原、蛋白多糖、糖蛋白等, 细胞的结构也由星形转变为具有发达的粗面内质网和高尔基复合体的成纤维细胞样细胞或肌成纤维细胞^[12], 正常肝脏中HSC处于静息状态, 增殖活性很低, 肝损伤及各种慢性肝病时被激活, 表型发生改变: 由静息细胞转变为移行细胞, 然后转化为肌成纤维细胞样细胞^[13]。而激活的HSC的凋亡是肝纤维化得以逆转的中心事件^[14,15]。

总之, 肝纤维化的发生机制是一个非常复杂的病理过程, 涉及许多不同水平的调节, 越来

越多的研究表明HSC是ECM的主要来源, 在肝损伤时HSC的活化伴随着基质合成的增加, 可能是肝纤维化发生的关键因素。近年来, 在肝纤维化形成机理研究中又引入了信号转导的新概念, 这将使该领域的研究进入一个深的层次。

本实验结果显示ALD患者口服Vit A 18 mo以后PIIIP和HA含量明显下降, 而对照组无明显变化, 从而证明Vit A能够减轻ALD患者肝脏纤维化。

4 参考文献

- 1 郑芝田, 林三仁. 胃肠病学. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2000; 1175
- 2 李定国, 陆汉明, 陈颖伟. 汉防己甲素抗肝纤维化研究进展. 世界华人消化杂志 1999; 7: 171-172
- 3 Ballardini G, Faccani A, Bianchi FB, Fallani M, Patrono D, Capelli M, Pisi E. Steroid treatment lowers hepatic fibroplasia, as explored by serum amino-terminal procollagen III peptide, in chronic liver disease. *Liver* 1984; 4: 348-352
- 4 Guluov MV, Stoyanov HD, Juliano VAE. Immunohistochemical detection of collagen type III and IV in relation with transformation Ito cells in liver sinusoids of patients with reactive biliary hepatitis]. *Acta-Histochem* 1999; 101 :213
- 5 李春辉, 潘理会. 肝纤维化发生机制的研究进展. 承德医学院学报 2005; 22: 62
- 6 张鲁榕, 孔宪涛. 透明质酸在疾病中改变的研究进展. 国外医学消化系疾病分册 1991; 11: 26
- 7 Nanni G, Majorani F, Maloberti G, Canepa C, Casu A. Action of chronic CC14 on the retinol and dolichol content of rat liver parenchymal and non-parenchymal cells. *Life Sci* 2000; 67: 2293-2304
- 8 Brenner DA, Waterboer T, Choi SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, Yamauchi M, Gillan A, Rippe RA. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol*

- 2000; 32: 32-38
- 9 Lee KS, Lee SJ, Park HJ, Chung JP, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Med J* 2001; 42: 1-8
- 10 Ohata M, Lin M, Satre M, Tsukamoto H. Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am J Physiol* 1997; 272: G589-G596
- 11 Vicente CP, Fortuna VA, Margis R, Trugo L, Borojevic R. Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an *in vitro* model of hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 1998; 187: 11-21
- 12 Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 425-431
- 13 Bissell DM. The origin of hepatic myofibroblasts. *Journal of Hepatology* 2002; 37: 298
- 14 Wright MC, Issa R, Smart DE, Trim N, Murray GI, Primrose JN, Arthur MJ, Iredale JP, Mann DA. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2001; 121: 685-698
- 15 Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000; 156: 1235-1243

■同行评价

本研究通过外源性给与维生素A, 观察其对慢性酒精性肝病患者血清Ⅲ型前胶原肽及血清透明质酸的变化, 探讨维生素A对肝脏纤维化形成的抑制作用, 较准确反映研究内容的科学意义, 科学结果明确, 有系统的理论分析和有价值的科学结论。

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

技法与经验

《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验。我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿, 免费刊登彩色照片。写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法

1.1 原理

1.2 适应证

1.3 器材准备

1.4 步骤

1.5 实例

2 结果

3 讨论

3.1 并发症

3.2 优点和缺点

3.3 经验与技巧

4 参考文献

NF- κ B 在溃疡性结肠炎激素抵抗中的意义

刘一品, 李延青

■背景资料

迄今, 溃疡性结肠炎(UC)的病因和发病机制尚未明确, 治疗主要手段之一是使用激素, 但在临床中约1/4左右的UC患者对激素治疗不敏感, 即激素抵抗, 给患者增加了不必要的激素副作用及经济负担, 也为临床治疗带来了新的课题。

刘一品, 烟台毓璜顶医院消化内科 山东省烟台市 264000
李延青, 山东大学齐鲁医院消化内科 山东省济南市250012
通讯作者: 李延青, 250012, 山东省济南市文化西路107号, 山东大学齐鲁医院消化内科. mx8902@163.com
电话: 0531-2169508
收稿日期: 2005-06-30 接受日期: 2005-07-15

Role of nuclear factor-kappa B expression in steroid-resistant ulcerative colitis

Yi-Pin Liu, Yan-Qing Li

Yi-Pin Liu, Department of Gastroenterology, Yuhuangding Hospital of Yantai, Yantai 264000, Shandong Province, China

Yan-Qing Li, Department of Gastroenterology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China

Correspondence to: Dr. Yan-Qing Li, Department of Gastroenterology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China. mx8902@163.com
Received: 2005-06-30 Accepted: 2005-07-15

Abstract

AIM: To investigate the relationship between nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and the occurrence of ulcerative colitis (UC), and to explore the role of NF- κ B expression in steroid resistance of UC.

METHODS: The activation of NF- κ B was investigated in the UC biopsies from 15 steroid-resistant cases of the 20 steroid-sensitive patients with an acute episode of moderate or severe UC. Sixteen normal persons were used as controls.

RESULTS: Before the steroid treatment, the expression of NF- κ B p65 were significantly different between the steroid-resistant patients and the normal controls (6.1 ± 2.9 vs 1.1 ± 0.8 , $P < 0.01$), as well as between the steroid-sensitive patients and the normal controls (5.9 ± 2.7 vs 1.1 ± 0.8 , $P < 0.01$). There was no significant difference between the steroid-sensitive group and the steroid-resistant group before the steroid treatment ($P > 0.05$), while there was significant difference between them after the steroid treatment (1.3 ± 0.8 vs 5.4 ± 2.4 , $P < 0.01$). The expression of NF- κ B p65 in the

steroid-sensitive group has significant difference before and after the steroid treatment (5.9 ± 2.7 vs 1.3 ± 0.8 , $P < 0.01$), while no significant difference in the steroid-resistant group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The expression of NF- κ B p65 is closely related with the occurrence and development of UC. The changes of NF- κ B expression before and after the steroid treatment may be helpful for the identification of steroid resistance and can be used as an index for the early recognition of steroid resistance.

Key Words: Nuclear factor κ B; Ulcerative colitis; Steroid resistance; Immunohistochemistry

Liu YP, Li YQ. Expression of nuclear factor-kappa B in steroid-resistant ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):238-241

摘要

目的: 探讨NF- κ B与溃疡性结肠炎(UC)发病关系及其在激素抵抗中的意义。

方法: 选择活动期中度以上UC患者35例, 均予强的松治疗(20-40 mg/d)4 wk. 根据治疗反应分为激素敏感组和激素耐药组, 均作为实验组, 检测激素治疗前、治疗后结肠病变黏膜组织中的NF- κ B表达水平. 设立正常对照组16例。

结果: 在激素治疗前, 激素敏感组、激素抵抗组NF- κ B p65表达水平分别与正常对照组比较, 差异有显著性(5.9 ± 2.7 , 6.1 ± 2.9 vs 1.1 ± 0.8 , $P < 0.01$). 在激素治疗前, 激素敏感组和激素抵抗组之间比较, 差异无显著性($P > 0.05$). 在激素治疗后, 激素敏感组和激素抵抗组之间比较, 差异有显著性(1.3 ± 0.8 vs 5.4 ± 2.4 , $P < 0.01$). 在激素治疗前后, 激素敏感组自身比较, 差异有显著性(5.9 ± 2.7 vs 1.3 ± 0.8 , $P < 0.01$). 而激素抵抗组在前后结果的比较中, 差异无显著性($P > 0.05$).

结论: NF- κ B与UC关系密切, 在UC的发病机制中起重要作用. NF- κ B在激素治疗前后的变

化有助于判断UC患者是否对激素抵抗, 可以作为进一步预测激素抵抗的一个较早期的诊断指标.

关键词: 核因子- κ B; 溃疡性结肠炎; 激素抵抗; 免疫组织化学法

刘一品, 李延青. NF- κ B在溃疡性结肠炎激素抵抗中的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(2):238-241
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/238.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 系原因不明的大肠黏膜的慢性炎症和溃疡性病变. 本病在我国近10 a发病率呈上升趋势, 报道增多^[1]. 核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)是在进化学上高度保守的一种转录因子, 广泛存在于各种组织中, 在免疫和炎症反应、细胞生长、病毒感染及某些疾病急性期反应等方面起着重要作用^[2-6]. 已证明, 许多UC临床治疗用药如糖皮质激素的药理作用均与抑制NF- κ B活性有关. 但同时我们在临床中发现相当一部分患者对激素治疗不敏感, 即激素抵抗, 其机制不清. 我们通过研究NF- κ B表达水平在UC患者进行激素治疗过程中的变化特点, 探讨NF- κ B在UC的发病机制中的作用, 以及在发生激素抵抗时的机制及意义, 从而为临床治疗开辟新的思路.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例选择 2002-10/2004-08选择我院门诊及住院的溃疡性结肠炎患者35例, 其中男18例, 女17例, 年龄20-65岁(平均38.4岁). 所有病例均为活动期中度以上患者(参照Truelove-Witts标准^[7]), 均需应用糖皮质激素治疗, 每位患者均给予强的松治疗, 每日剂量20-40 mg, 疗程4 wk. 根据激素治疗反应分为两个组: 病情缓解者为激素敏感组(glucocorticoid sensitive, CS)($n = 20$)和病情不缓解者为激素耐药组(glucocorticoid resistant, CR)($n = 15$), 均作为实验组, 检测激素治疗前、治疗后结肠病变黏膜组织中的NF- κ B表达水平. 同时设立正常对照组16例, 均为结肠镜、钡灌肠、生化检查正常者, 检测正常结肠黏膜组织中的NF- κ B表达水平.

1.1.2 溃疡性结肠炎诊断标准 2000年全国炎症性肠病学术研讨会, 中华医学会消化病学会于成都

制定的"对炎症性肠病诊断治疗规范的建议"^[8].

1.1.3 溃疡性结肠炎入选标准 在开始研究之前4 wk未曾接受糖皮质激素、柳氮磺胺吡啶、5-ASA、环孢菌素A、环磷酰胺等免疫抑制剂治疗; 无严重的冠心病、高血压病、糖尿病、活动性肺结核、消化性溃疡、重症感染等禁忌证.

1.1.4 激素敏感组/激素抵抗组判断标准 在开始4 wk激素治疗前和治疗后均计算每个患者的疾病活动度, 即UC的临床活动性指数(colitis activity index, CAI)^[9]. 所有应用激素治疗的患者对激素治疗的反应均遵照以下规定: 患者接受4 wk强的松治疗(剂量 >20 mg/d)后病情缓解者($CAI \leq 4$), 被认为是激素敏感(glucocorticoid sensitive, CS); 4 wk内病情未缓解, CAI指数下降不低于5($CAI \geq 5$)或者需外科手术治疗者, 被认为是激素抵抗(glucocorticoid resistant, CR).

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器设备 鼠抗人NF- κ B p65单克隆抗体购自Santa Cruz biotechnology公司, SP试剂盒, DAB显色剂, edta抗原修复液(1 mmol/L, pH8.0); 日本fujinon EC-410HM电子结肠镜, olympus CF240电子结肠镜, olympus-BX51光学显微镜, 德国产leica -RM2135型病理石蜡切片机, 日本sakura Tissue-Tek型自动脱水机, 国产立鹤牌电热恒温培养箱, 容声牌RS-210型冰箱.

1.2.2 标本制备 所有溃疡性结肠炎患者及正常对照组患者均行结肠镜检查, 分别在病变结肠黏膜上及正常黏膜上用活检钳取材, 福尔马林固定, 石蜡包埋, 制备4 μ m厚组织切片, 用于NF- κ B表达的检测.

1.2.3 步骤 二甲苯溶液脱蜡, 依次1 000, 950, 750 mL/L乙醇水化, 蒸馏水洗净; 30 mL/L过氧化氢浸泡孵育阻断内源性过氧化物酶, PBS冲洗; 置edta抗原修复液中, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 自然冷却至室温, PBS冲洗; 滴加非免疫性动物血清, 37 $^{\circ}$ C 15 min, 封闭非特异性抗原; 滴加NF- κ B p65单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C过夜, 37 $^{\circ}$ C复温60 min, PBS冲洗; 生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}$ C 12 min, PBS冲洗; 辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育12 min, PBS冲洗; DAB溶液显色; 冲洗, 苏木素复染, 脱水, 中性树脂封片. PBS代替一抗作阴性对照.

1.2.4 结果判断 所有切片均在同一条件的光学显微镜下观察, 结果以胞核或胞质中发现棕黄色或褐色颗粒状物者为阳性细胞(NF- κ Bp65), 阴性对照应无棕黄色反应产物. 采用以下染

■研究前沿

近年研究显示, NF- κ B与炎症性肠病关系密切, 在UC的发生、发展中具有重要地位. 而UC治疗过程中发生激素抵抗也是临床中的常见问题和治疗难点.

■创新盘点

目前有关NF- κ B在UC激素治疗时的变化特点及发生激素抵抗时的机制、意义,国内尚未见系统全面的研究报道。

表1 激素治疗前溃疡性结肠炎与正常组NF- κ Bp65表达水平比较

组别	<i>n</i>	NF- κ Bp65
正常组	16	1.1 \pm 0.8
激素敏感组	20	5.9 \pm 2.7 ^b
激素抵抗组	15	6.1 \pm 2.9 ^b

^b*P* < 0.01, vs 正常组。

色积分评价标准^[10]: 染色强度分为4级: 0 = 阴性染色, 1 = 弱阳性染色, 2 = 中度阳性染色, 3 = 强阳性染色; 每张切片按所见阳性细胞范围分为5级: 0 = 阴性, 1 = 阳性细胞占1-25%, 2 = 阳性细胞占26-50%, 3 = 阳性细胞占51-75%, 4 = 阳性细胞占76-100%。每张切片的染色积分以这二者乘积之和表示。

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 所有数据录入微机, 应用SPSS10.0统计软件, 将UC组病例与正常对照组的阳性细胞染色积分所得数据建立数据库, 进行*t*检验、秩和检验。所有分析显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

在正常结肠黏膜组织中, NF- κ B p65无或仅有弱阳性表达。在激素治疗前, 溃疡性结肠炎激素敏感组、激素抵抗组分别与正常对照组表达水平的比较, 差异有显著性(^b*P* < 0.01)(表1)。

在激素治疗前, NF- κ B p65表达水平在激素敏感组和激素抵抗组之间比较无显著性差异(5.9 \pm 2.7 vs 6.1 \pm 2.9, *P* > 0.05)。在激素治疗后, NF- κ Bp65表达水平在激素敏感组和激素抵抗组之间比较, 具有显著性差异(1.3 \pm 0.8 vs 5.4 \pm 2.4, ^b*P* < 0.01)。

在激素治疗前后, 激素敏感组的NF- κ Bp65的表达水平比较具有显著差异性(5.9 \pm 2.7 vs 1.3 \pm 0.8, *P* < 0.01)。而激素抵抗组在前后结果的比较中无显著性差异(6.1 \pm 2.9 vs 5.4 \pm 2.4, ^b*P* > 0.05)。

3 讨论

迄今, UC的特异性致病因素和发病机制尚未明确, 近年研究显示, NF- κ B与UC关系密切^[11-13], 提示NF- κ B在UC的发生、发展中占有重要地位。已证明, 许多UC临床治疗用药如糖皮质激素均与抑制NF- κ B活性有关。糖皮质激素对NF- κ B活性的抑制正是其发挥广泛抗炎作用的基础。大多数患者对激素治疗有效, 但同时我们在临床中发现约1/4左右的UC患者对激素治疗不敏

感^[14], 即激素抵抗, 疗效欠佳, 其机制不清, 给患者增加了不必要的激素副作用及经济负担, 也为临床治疗带来了新的课题。目前NF- κ B在UC激素治疗时的变化特点及发生激素抵抗时的机制、意义, 国内尚未见研究报道。

我们对15例激素抵抗和20例激素敏感的UC患者进行分组研究, 分别给予4 wk的激素(强的松)治疗, 观察疗效, 并在激素治疗前后进行结肠黏膜活检, 通过免疫组织化学染色法检测NF- κ B表达活性。结果发现UC患者中NF- κ B表达水平明显增强, 激素抵抗组对激素治疗不敏感, 病情未得到缓解, 而激素敏感组对激素治疗效果理想, 进入了缓解期。在激素治疗前, NF- κ B p65表达水平在激素敏感组和激素抵抗组之间比较无显著性差异(*P* > 0.05), 说明在UC急性活动期NF- κ B表达水平在激素敏感组与激素抵抗组之间并无差异, 与病情的活动性相一致。而在激素治疗后, NF- κ B p65表达水平在激素敏感组和激素抵抗组之间比较具有显著性差异(^b*P* < 0.01), 激素敏感组NF- κ B表达水平明显下降, 同时病情得到缓解, 而激素抵抗组NF- κ B表达水平并无变化, 仍然处于高水平, 未能进入缓解期。这表明NF- κ B的表达水平与UC的病情活动性密切相关, 在病情活动期具有高表达活性, 病情缓解期活性降低或失活, 而通过检测其表达水平的强度, 亦有助于判断疾病处于活动期或缓解期。

在本研究中, 我们发现激素敏感组的NF- κ B的表达水平在激素治疗前后相比较具有显著性差异(^b*P* < 0.01), 呈现明显下降的趋势。而激素抵抗组在激素治疗前后比较中无显著性差异(*P* > 0.05), 基本保持治疗前的高水平表达。经过4 wk的激素系统治疗, 对激素敏感的UC患者, 病情缓解, 其黏膜组织中NF- κ B表达活性明显减弱, 说明NF- κ B表达活性受到了抑制, 而抑制NF- κ B有助于炎症的缓解。但是激素抵抗的UC患者NF- κ B水平无明显变化, 仍保持高水平状态, 这说明NF- κ B活性未能得到抑制, 病情未缓解。由此我们可以推测NF- κ B表达水平与疾病活动度、激素治疗反应相一致, 从激素治疗前后NF- κ B表达活性的变化上可以推测患者对激素治疗的反应与效果, 即激素抵抗亦或激素敏感。

体外实验发现糖皮质激素(GC)可通过以下途径抑制NF- κ B活化: (1)通过与糖皮质激素受体(GR)结合, 使其活化后在核内与NF- κ B p65相互作用, 抑制NF- κ B功能。(2)活化的GR激活糖皮质激素反应元件(GRE), 上调I κ B表达, 从而影响

NF- κ B活化^[11,15]. 糖皮质激素GC与GR结合是其发挥作用的一个重要环节.从理论上推断, UC的治疗过程中出现激素抵抗, 必定是由于以上某个环节或某些途径出现了障碍. 众多文献报道, GR的主要生理构型为GR α , 而GR β 不与GC结合, GR β 抑制内源性GR α 的活性, 且GR β 介导抑制作用广泛见于糖皮质激素启动子的诱导中, 故有人提出GR β 存在的意义就是拮抗GR α 的功能. Honda *et al*^[16]报道, 外周血单个核细胞(PBMC)表达的糖皮质激素受体(GR β)特异mRNA可见于83%的激素抵抗UC, 激素敏感和正常对照中为9%. 基于此发现, 遂提出检测PBMC的GR β mRNA的表达可预测UC中糖皮质激素的疗效. 但少数学者报道并未发现GR β 具有拮抗GR α 的功能. Bantel *et al*^[14]认为UC激素抵抗机制可能是NF- κ B阻止GR α 与DNA结合, 抑制其抗炎因子的产生, 导致激素不敏感. 上述论点均有一定的理论依据, 值得进一步前瞻性研究.

总之, 我们的研究表明, NF- κ B在UC发病中占有重要地位, 它参与了一系列免疫炎症反应有关的基因转录调控, 其表达水平与UC的病情活动性密切相关, 通过检测其表达水平的强度, 有助于判断疾病处于活动期或缓解期, 这说明NF- κ B在UC的疾病活动中可能起到枢纽作用. 同时我们发现对NF- κ B活性的抑制, 有助于UC的治疗及病情的缓解, 监测激素治疗中NF- κ B表达水平的变化, 可以作为进一步预测激素抵抗的一个较早期的诊断指标, 避免今后多次重复治疗中激素的应用, 利于制定新的治疗方案, 从而为激素抵抗患者减少了大量的激素副作用及节省了医疗费用. 而由于激素抵抗的存在, 也说明NF- κ B并非UC唯一的发病因素, 是否涉及多个转录因子? 他们间的相互作用如何? 这些均有待于我们进一步去研究发现, 以便于更好的治疗UC患者.

4 参考文献

- 1 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10 218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-61
- 2 Chen YG, Zhang C, Chiang SK, Wu T, Tso MO. Increased nuclear factor-kappa B p65

- immunoreactivity following retinal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Neurosci Res* 2003; 72: 125-131
- 3 Zaninoni A, Imperiali FG, Pasquini C, Zanella A, Barcellini W. Cytokine modulation of nuclear factor-kappaB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 2003; 31: 185-90
- 4 Chen YM, Tu CJ, Hung KY, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS. Inhibition by pentoxifylline of TNF-alpha-stimulated fractalkine production in vascular smooth muscle cells: evidence for mediation by NF-kappa B down-regulation. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 950-958
- 5 Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Role of nuclear factor-kappa B activation in acute ischaemia-reperfusion injury in myocardium. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 894-900
- 6 Calder VL, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Antigen-specific T-cell downregulation by human dendritic cells following blockade of NF-kappaB. *Scand J Immunol* 2003; 57: 261-270
- 7 Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2: 1041-1048
- 8 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华内科杂志* 2001; 40: 138-141
- 9 Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ* 1989; 298: 82-86
- 10 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
- 11 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484
- 12 Neurath MF. Pathogenesis of inflammatory bowel disease: transcription factors in the spotlight. *Gut* 1998; 42: 458-459
- 13 Nosti-Escanilla MP, Pena AS. NF-kappa B and inflammatory intestinal diseases. *Rev Esp Enferm Dig* 1998; 90: 113-119
- 14 Bantel H, Domschke W, Schulze-Osthoff K, Kaskas B, Gregor M. Abnormal activation of transcription factor NF-kappaB involved in steroid resistance in chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1845-1846
- 15 Thiele K, Bierhaus A, Autschbach F, Hofmann M, Stremmel W, Thiele H, Ziegler R, Nawroth PP. Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* 1999; 45: 693-704
- 16 Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, Kohgo Y. Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000; 118: 859-66

■应用要点

监测UC激素治疗过程中NF- κ B表达水平的变化, 可以作为进一步预测激素抵抗的一个较早期的诊断指标, 避免今后多次重复治疗中激素的应用, 利于制定新的治疗方案, 从而为激素抵抗患者减少了大量的激素副作用及节省了医疗费用.

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

自体骨髓干细胞肝移植1例

朱晓玲, 邢煜, 时冰, 李艳

■背景资料

本文对一例肝硬化失代偿期患者进行自体骨髓干细胞移植, 探讨了自体骨髓干细胞移植的可行性。

朱晓玲, 邢煜, 时冰, 李艳, 辽宁省人民医院消化内科 辽宁省沈阳市 110016

通讯作者: 朱晓玲, 110016, 辽宁省沈阳市沈河区文艺路33号, 辽宁省人民医院消化内科. chenxiaoling57@163.com

电话: 024-24158018

收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-12-08

摘要

肝硬化失代偿期患者, 取自体骨髓125 mL, 提取干细胞总数 8.43×10^6 , 经肝动脉注入肝内, 术中、术后无不良反应, 症状好转, 肝性脑病纠正, 肝功恢复, 腹水、胸水减少. 认为, 自体骨髓干细胞肝移植有临床应用可行性, 疗效有待观察。

关键词: 骨髓干细胞; 肝动脉; 肝移植; 治疗; 肝硬化

朱晓玲, 邢煜, 时冰, 李艳. 自体骨髓干细胞肝移植1例. 世界华人消化杂志 2006;14(2):242-243

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/242.asp>

1 病例报告

患者, 男, 42岁. 4 a前因乏力、腹胀就诊, 诊断乙型肝炎, 保肝对症治疗. 2 a前被确诊为乙型肝炎肝硬化肝功能失代偿期合并食管静脉曲张破裂出血, 行脾切除术、断流术. 半年前CT动脉造影诊断肝左叶早期癌变, 癌灶直径1.9 cm, 行叶段超选择性栓塞治疗. 患病以来一直坚持保肝对症治疗, 乏力、腹胀时有发生. 断流手术后, 反复出现肝性脑病, 每周数次, 经常不明原因发热, 对症治疗可好转. 1 mo前呕血、黑便, 给与抑酸剂、生长抑素及输血等治疗好转出院. 2005-09-26因再次呕吐咖啡色胃内容物约400 mL, 伴头晕、腹泻稀水样便, 呼吸困难, 发热(38°C)、排尿少、睡眠障碍等来院. 入院检查: T 37.5°C , P 80 次/min, R 20 次/min, BP 16/11 kPa(120/80 mmHg), 发育正常, 营养中等, 慢性病容, 神志清晰, 查体合作, 面色苍白, 肝掌阳性, 颈部可见蜘蛛痔, 巩膜无黄染, 睑结膜和口唇苍白, 心脏正常, 双下肺呼吸音弱, 叩诊实音, 腹部膨隆, 腹水征阳性. 化验室检查: WBC $9.3 \times 10^9/\text{L}$, N 0.725, RBC $2.64 \times 10^{12}/\text{L}$, Hb 91 g/L, PLT $103 \times 10^9/\text{L}$, ALT 830.1 nkat/L,

ALB 26.6 g/L, GLO 30.9 g/L, TBIL $39.6 \mu\text{mol/L}$, DBIL $12.9 \mu\text{mol/L}$, IBIL $26.7 \mu\text{mol/L}$, 总胆汁酸 $20.5 \mu\text{mol/L}$, AST 860.1 nkat/L. 乙肝表面抗原阳性(测试值13.457), 乙肝核心抗体阳性(测试值0.121), 乙肝e抗原阴性, 乙肝表面抗体阴性, 乙肝e抗体阴性, 抗HCV阴性. 彩超和CT诊断肝硬化、腹水. 胸腹水常规检查未见瘤细胞. 诊断乙型肝炎肝硬化失代偿期(Child C)并胸水、腹水及消化道出血, 早期肝癌栓塞治疗后, 脾切除、断流术后, 肝性脑病. 予止血、抗肝性脑病、抽胸水等支持对症治疗, 出血停止, 腹水减轻, 但肝性脑病和胸水改善不明显. 2005-10-23肝性脑病加重伴呼吸困难, 并于2005-10-25, 在手术室采集骨髓125 mL, 分离净化提取干细胞总数 8.43×10^6 , 经右肝动脉缓慢注入肝内, 术后病人无任何不适. 1 wk复查肝功能: ALT 575.1 nkat/L, TP 69.3 g/L, ALB 33.1 g/L, GLO 36.2 g/L, TBIL $28.7 \mu\text{mol/L}$, DBIL $9.4 \mu\text{mol/L}$, IBIL $19.3 \mu\text{mol/L}$, 总胆汁酸 $16.6 \mu\text{mol/L}$. WBC $5.7 \times 10^9/\text{L}$, N 0.535, RBC $3.22 \times 10^{12}/\text{L}$, Hb 110 g/L, PLT $107 \times 10^9/\text{L}$. 术后20 d Hb 113 g/L, PLT $111 \times 10^9/\text{L}$ ALT 501.7 nkat/L, ALB 35.8 g/L, TBIL $23.7 \mu\text{mol/L}$, DBIL $8.6 \mu\text{mol/L}$, AST 695.1 nkat/L. 术后观察2 mo, 肝性脑病未再发作, 不明原因发热情况未再出现, 腹水、胸水减轻, 乏力情况好转。

2 讨论

慢性病毒性肝炎、肝硬化、肝癌的治疗一直是一个全球性的难题, 目前原位肝移植是治疗的最佳选择, 但由于供体器官紧缺, 同时手术复杂、费用高、移植后免疫排斥等并发症及生存率不高等缺点限制了应用. 肝细胞移植治疗难治性肝病也取得了一定的疗效, 但由于肝细胞在体外不能大量繁殖, 且传代后不能保持其原有特性而难以推广应用。

近年来骨髓干细胞肝移植的研究已经开始. 王平 *et al*^[1]进行了大鼠自体骨髓干细胞经门脉肝移植实验研究. 廖彩仙 *et al*^[2]进行了自体骨髓肝内移植治疗肝硬化的实验研究, 证明可以治疗鼠

肝纤维化. 吴理茂 *et al*^[3]采用自体骨髓干细胞移植与归元方联用治疗急慢性肝损伤实验研究, 证明有治疗肝功能衰竭作用. 干细胞肝移植治疗危重肝病方面还缺乏报道. 本例对乙型肝炎后肝硬化失代偿期(Child C)伴胸水和消化道出血患者, 实施自体骨髓干细胞经肝动脉移植治疗, 过程顺利, 患者无任何不良反应, 证明继廖彩仙、吴理茂 *et al*动物试验后, 可以在人体实施采集自体骨髓干细胞肝移植治疗. 本病例已经观察2 mo, 从临床症状看, 术前患者经常发作肝性脑病和不明原因发热, 术后未出现, 术前胸水增长很快, 几天不抽胸水, 患者即出现呼吸困难, 术后胸水未增加, 患者自觉有减少, 无呼吸困难发生, 也不需要像术前那样依靠抽胸水, 解决呼吸困难的痛苦. 术后肝功能较术前明显好转, 术后20 d血色素、血小板较术前增加, 白蛋白恢复正常, 胆红素下

降. 但本研究仅属个例观察, 还需要更多的临床病例证明. 总之, 采用骨髓干细胞肝内移植术治疗终末性肝功能衰竭和肝硬化, 目前在国际上还属于刚刚起步, 对其确切疗效和并发症等还有待于大量临床观察, 有关骨髓采集量、干细胞移植数、移植途径及远期疗效等尚需长时间临床观察.

3 参考文献

- 1 王平, 王建华, 颜志平, 胡美玉, 王艳红, 李文涛, 林根来. 大鼠骨髓基质细胞分离培养和经门静脉途径的初步研究. 中华放射学杂志 2004; 2: 129-131
- 2 廖彩仙, 张晓东, 植一丹. 应用自体骨髓肝内移植治疗肝硬化的实验研究. 中华医学研究杂志 2004; 4: 215-215
- 3 吴理茂, 李连达, 刘红, 宁可永, 李贻奎. 自体骨髓干细胞移植与归元方联用治疗急慢性肝损伤实验研究. 中国工程科学 2004; 6: 34-42

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

本刊讯 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下.

1 征文内容

本次会议的征文内容包括: (1)介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果; (2)结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应症和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果; (3)中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应证、临床疗效和经验教训; (4)中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择; (5)中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验; (6)采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验; (7)肛门、结直肠损伤及异物处理的经验; (8)介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物.

2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性; 全文4000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄: (1)广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编518029, 电话: 0755-82699768, 手机: 13714327555, email: kewe1968@126.com; (2)深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机: 13923803457, email: ssshhqq66@163.com.

3 其他

本次会议可授予国家级继续教育I类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知. 欢迎广大相关领域工作及研究人员参加.

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿),我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力,提高了《世界华人消化杂志》的学术质量,在此表示衷心感谢!

陈仕珠 主任医师
解放军第451医院

董蕾 教授
西安交通大学第二医院消化内科

和水祥 副教授
西安交通大学第一医院消化内科

侯晓华 教授
华中科技大学同济医学院协和医院消化内科

江学良 副主任医师
第二军医大学长海医院消化科

来茂德 教授
浙江大学医学院病理学教研室

兰林 副教授
重庆第三军医大学西南医院全军感染病研究所

劳绍贤 教授
广州中医药大学

李伯安 教授
解放军第302医院临检中心

李增山 副教授
西安第四军医大学病理教研室

刘连新 教授
哈尔滨医科大学附属第一医院普通外科

南极星 副教授
延边大学医学院

牛建昭 教授
北京中医药大学

钱会南 副教授
北京中医药大学

秦环龙 副教授
上海交通大学附属第六人民医院

秦仁义 教授

华中科技大学同济医学院附属同济医院外科

任建林 副教授
厦门大学中山医院

谭学瑞 主任医师
广东省汕头市市长平路57号

吴梧桐 教授
中国药科大学生物制药学院

向德兵 讲师
重庆第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科

许洪卫 教授
上海市第十人民医院

喻荣彬 副教授
南京医科大学流行病与卫生统计学系

姚云清 副教授
重庆医科大学附属第一医院

于皆平 教授
湖北医科大学附属第一医院消化内科

岳茂兴 教授
北京解放军第306医院(总装备部总医院)普通外科

于颖彦 教授
上海第二医科大学附属瑞金医院消化外科研究所

张建中
解放军306医院病理

张锦生 教授
上海复旦大学上海医学院病理学系

张万岱 教授
第一军医大学南方医院全军消化内科研究所

张宗明 教授
清华大学第一医院院长办公室

钟鸣 研究员
广西民族医药研究所